

**IMMUNOLOGISCHES MONITORING NACH
NIERENTRANSPLANTATION.**

**DIFFERENZIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN MIT
MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN IM PERIPHEREN BLUT
UND IM FEINNADELASPIRAT**

JOSEF STADLER

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(DIREKTOR: PROF. DR. DR. W. BRENDL)

Immunologisches Monitoring nach
Nierentransplantation.
Differenzierung von mononukleären Zellen
mit monoklonalen Antikörpern im
peripheren Blut und im Feinnadelaspirat.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stadler Josef

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Brendel

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 5. 86

Verwendete Abkürzungen

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ALG	Antilymphozytenglobulin
AR	Akute zelluläre Reaktion
ATG	Antithymozytenglobulin
Aza	Azathioprin
B-Zellen	Bursaabhängige Zellen
CDC	Complement dependent cytotoxicity
C.I.	Corrected increment
CML	Cell mediated lymphotoxicity
CMV	Zytomegalievirus
Cy-A	Cyclosporin-A
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
E/M antibodies	Anti-Endothel/Monozyten Antikörper
FNA	Feinnadelaspirat
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
HLA	Human leucocyte antigens
HSV	Herpes Simplex Virus
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KBR	Komplementbindungsreaktion
KG	Körpergewicht
LMC	Lymphocyte mediated cytotoxicity
Ly	Lymphozyten
MLC	Mixed lymphocyte culture
MoAk	Monoklonale Antikörper
MP	Methylprednisolon
OKM	Orthoklone anti-monocyte antibodies (Warenbezeichnung der Firma Ortho Pharmaceutical Corporation)

OKT	Orthoklone anti-T-cell antibodies (Warenbezeichnung der Firma Ortho Pharmaceutical Corporation)
p.B.	Peripheres Blut
RBC	Red blood cells
T/B crossmatch	T- and B-cell crossmatch
T 4 Zellen	OKT 4 markierte Zellen
T 8 Zellen	OKT 8 markierte Zellen
T 3 Zellen	OKT 3 markierte Zellen
VCA	Virus Capsid Antigen
VZV	Varizella Zoster Virus

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Patientengut und klinische Verlaufsbeobachtungen	4
2.1 Grunddaten	4
2.1.1 Art der Transplantationen	4
2.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung	5
2.2 Empfänger-Spender Auswahl	6
2.3 Immunsuppressive Therapie	6
2.3.1 Therapieschemata der Azathioprin- gruppe	7
2.3.2 Therapieschemata der Cyclo- sporin-A Gruppe	9
2.3.3. Konversionen	11
2.3.4 Einteilung der Patienten in Therapiegruppen	12
2.4 Verlaufsbeobachtungen	13
2.4.1 Abstoßungskrisen	13
2.4.2 Virusinfektionen	14
2.5 Auswahl der Patienten	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Monitoring im peripheren Blut	16
3.1.1 Gewinnung des mononukleären Konzentrats	16
3.1.2 Markierung mit monoklonalen Antikörpern	17
3.1.3 Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop	20

3.2	Monitoring in situ	21
3.2.1	Feinnadelaspirationszytologie	21
3.2.1.1	Feinnadelbiopsie	21
3.2.1.2	Material zur Zytologie des peripheren Blutes	22
3.2.1.3	Herstellung des Zytozentrifugen- Präparates	22
3.2.1.4	Färbung und Differenzierung	23
3.2.1.5	Kriterien der Beurteilung	25
3.2.2	Markierung mit monoklonalen Antikörpern	27
3.2.3	Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop	28
3.3	Statistische Berechnungen	28
4.	Ergebnisse	30
4.1	Untersuchungen im peripheren Blut	30
4.1.1	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei Normalpersonen	30
4.1.2	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats unter Immunsuppression bei negativer Virusserologie	33
4.1.2.1	Kontrollgruppen	33
4.1.2.2	Vor Abstoßungskrisen	37
4.1.2.3	Unter zusätzlicher Abstoßungs- therapie	41
4.1.3	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe	46

4.1.3.1	Epstein-Barr Virus Infektionen	46
4.1.3.2	Zytomegalie Virus Infektionen	47
4.1.3.3	Herpes Simplex Virus Infektionen	52
4.1.3.4	T- und B-Zell Parameter bei Virusinfektionen im Vergleich mit nicht unter Virusinfektion bestimmten Werten	54
4.2	Untersuchungen im Feinnadel- aspirat	59
4.2.1	Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei negativer Virusserologie	60
4.2.1.1	Azathioprin Basistherapie	60
4.2.1.2	Cyclosporin-A Basistherapie	64
4.2.1.3	Überwiegen der T 4+ Zellen im Feinnadelaspirat	67
4.2.2	Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe	70
5.	Diskussion	74
5.1	Diskussion der Untersuchungen des peripheren Blutes	74
5.1.1	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats von Normalpersonen	74
5.1.2	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats unter Immunsuppression bei negativer Virusserologie	75
5.1.2.1	Basistherapiegruppen	75
5.1.2.2	Vor Abstoßungskrisen	79
5.1.2.3	Unter zusätzlicher Abstoßungs- therapie	81

5.1.3	Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe	84
5.2	Diskussion der Untersuchungen im Feinnadelaspirat	91
5.2.1	Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei negativer Virusserologie	92
5.2.2	Überwiegen der T 4+ Zellen im FNA	95
5.2.3	Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe	97
6.	Zusammenfassung	100
LITERATURVERZEICHNIS		103

1. Einleitung

Die allogene Organtransplantation hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer erfolgreichen Therapieform bei der terminalen Insuffizienz verschiedener Organe entwickelt. Speziell bei der Transplantation von Nieren waren die chirurgisch-technischen Probleme relativ schnell gelöst (110). Sie sind nur noch in wenigen Fällen für einen Mißerfolg der Behandlung verantwortlich. Neben den Bemühungen um eine optimale Organisation der Organbeschaffung steht nach wie vor die Überwindung der Abstoßungsreaktion im Vordergrund der Anstrengungen (80). Die Komplexizität der Interaktionen zwischen Empfänger und Transplantat führte zur Entwicklung einer Vielzahl von immunologischen Tests. Mit ihnen hoffte man eine individuelle Abstimmung der Therapie und damit eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit zu erreichen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Untersuchungen im Rahmen dieses sog. "immunologischen Monitorings" zeigt Abbildung 1.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei relativ neue Methoden angewandt und miteinander kombiniert:

1. die Differenzierung von Subpopulationen mononukleärer Zellen durch monoklonale Antikörper und
2. die Gewinnung inflammatorischer Zellen aus dem Transplantat mit Hilfe der Feinnadelbiopsie.

Die monoklonalen Antikörper erwiesen sich schon bald nach der Erstbeschreibung ihrer Herstellung (92) als optimale Marker zellulärer Oberflächenantigene u.a. von Leukozyten (97). Den so gekennzeichneten Phänotypen leukozytärer Zellen konnten schon bald bestimmte Funktionen zugeordnet werden (166). Nach einer Transplantation konnte nun ihre Rolle in der Auseinandersetzung des Körpers mit

	PRETRANSPLANT		POST TRANSPLANT	
Donor-Specific	<u>Histocompatibility</u>	<u>Detection of Presensitization</u>	<u>Diagnosis of Rejection</u>	<u>Immunological Unresponsiveness</u>
	RBC antigens	T/B crossmatch	CDC	Specific CML unresponsiveness
	HLA antigens	CDC, ADCC, LMC	ADCC	Suppressor cells
		E/M antibodies	LMC	
		Memory cells		
Non Donor-Specific	<u>Measurement of Immunocompetence</u>	<u>Modulation of the Allograft Response</u>	<u>Diagnosis of Rejection</u>	<u>Measurement of Immunosuppression</u>
	Cutaneous sensitivity	Total lymphoid irradiation	Lymphocyte subpopulations	Antilymphocyte globulin
	Lymphocyte responsiveness	Blood transfusion	Lymphocyte responsiveness	Cyclosporin A
	Steroid sensitivity		Inflammation and graft damage	Host defence

Abb. 1: Aus Stiller C.R. et al.: "Immunologic Monitoring: Current Perspectives and Clinical Implications" (150)

dem fremden Organ analysiert werden (63). Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es deshalb, Veränderungen in der Zusammensetzung leukozytärer - speziell mononukleärer - Subpopulationen im peripheren Blut und im Aspirat der Feinnadelbiopsie in Bezug auf relevante immunologische Ereignisse zu verfolgen. Die Markierung der Zellen aus dem Transplantat versprach zudem eine Erweiterung der Möglichkeiten der bisher angewandten Aspirationszytologie, die als Grundlage der Auswertung der Ergebnisse diente (69). Bereits in dieser zytologischen Beurteilung deuteten sich verschiedene Inflammationsmuster an. Eine genauere Untersuchung der beteiligten Subpopulationen war daher ein zwingender Schritt, der der Kompliziertheit dieser Vorgänge etwas besser gerecht wurde.

Die Auswertung der Ergebnisse konzentrierte sich auf folgende Punkte:

1. auf eine frühzeitige Erkennung von Abstoßungskrisen und auf Hinweise, die eine Beurteilung eines Therapieerfolges erlaubten. Ein Fortschritt in dieser Richtung wäre im Hinblick auf eine Reduktion der erforderlichen Immunsuppression sehr wünschenswert (14).
2. auf die Untersuchung der Virusinfektionen der Herpes Virus Gruppe, denen eine entscheidende Bedeutung für die Morbidität und Mortalität nach Transplantation zukommt (143). So gilt z.B. die Zytomegalievirusinfektion bei einigen Untersuchern als die häufigste einzelne Ursache für Fieber nach Transplantation (125). Im Rahmen der Differentialdiagnose der Abstoßungsreaktion ist eine schnelle und zuverlässige Abgrenzung gegenüber diesen Infektionen extrem wichtig. Das immunologische Monitoring erschien dazu geeignet, da gerade Infektionen der Herpes Virus Gruppe die zellulären Abwehrmechanismen des betroffenen Organismus in typischer Weise beeinflussen (85).

2. Patientengut und klinische Verlaufsbeobachtungen

2.1 Grunddaten

2.1.1 Art der Transplantationen

Die Untersuchungen wurden von September 1981 bis September 1982 an insgesamt 103 Patienten des Transplantationszentrums München, Großhadern nach Kadavernierentransplantation durchgeführt. 98 Patienten wurden in diesem Zeitraum transplantiert. 5 Patienten waren bereits zuvor transplantiert worden. Die ebenfalls am Transplantationszentrum Großhadern durchgeführten Simultantransplantationen von Niere und Pankreas wurden nicht in die Untersuchungen aufgenommen.

86 Patienten erhielten zum erstenmal, 12 zum zweitenmal und ein Patient zum drittenmal eine fremde Niere. Bei 3 Patienten führten wir unser Monitoring sowohl bei der ersten, als auch bei der zweiten Transplantation durch.

Art der Transplantation	Patienten
Ersttransplantation	86
Erst- und Zweittransplantation	3
Zweittransplantation	12
Drittransplantation	1

Tabelle 1: Verteilung der Transplantationen

2.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung

76 Patienten (74%) waren männlich und 27 (26%) weiblich. Die jüngste Patientin war 16 und die älteste 60 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt lag bei 36.1 ± 11.7 Jahre. Aus Tabelle 2 kann man entnehmen, daß 80% aller Patienten zwischen 20 und 50 Jahre alt waren. In der Gruppe über 50 Jahre, die bisher als Risikogruppe galt (100), waren 14% der Patienten vertreten, während nur 7% der Gruppe unter 20 Jahren angehörten.

Alter	Patienten (n)	in %
10 - 19 Jahre	7	7
20 - 29 Jahre	29	28
30 - 39 Jahre	20	19
40 - 49 Jahre	33	32
50 - 59 Jahre	13	13
60 Jahre	1	1

Tabelle 2: Altersverteilung der nierentransplantierten Patienten

2.2 Empfänger - Spender Auswahl

Bei obligat negativer Kreuzprobe (56,112) und ABO-Blutgruppenübereinstimmung zeigte die Bestimmung der Transplantationsantigene des HLA-A, -B, -C Systems in vier Fällen volle Übereinstimmung. In 18 Fällen lagen eine, in 33 Fällen zwei, in 37 Fällen drei und in 11 Fällen vier Inkompatibilitäten, sog. "mismatches" vor (4,159). Die HLA-DR Antigene wiesen 41 Übereinstimmungen, 54 einfache "mismatches" und 8 mal keine Kompatibilität auf.

HLA-A, -B, -C "mismatch"	Prozent der Fälle	HLA-DR "mismatch"	Prozent der Fälle
0	4	0	40
1	17	1	52
2	32	2	8
3	36		
4	11		

Tabelle 3: Inkompatibilität der Spender- und Empfängertransplantationsantigene

2.3 Immunsuppressive Therapie

Zur Unterdrückung einer Abstoßungsreaktion wurden zwei verschiedene Medikamente als Basisimmunsuppressiva verwendet. Die eine Gruppe von Patienten

wurde mit Azathioprin¹⁾, die andere Gruppe mit Cyclosporin-A²⁾ behandelt. Als zusätzliches immunsuppressives Basismedikament wurde Methylprednisolon³⁾ in niedriger Dosierung bei beiden Gruppen verabreicht.

Bei dennoch auftretenden Abstoßungskrisen wurde eine Stoßtherapie mit hohen Dosen Methylprednisolon und eine Therapie mit Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) durchgeführt.

2.3.1 Therapieschemata der Azathiopringruppe

Azathioprin wird seit 1963 (5, 6) als Immunsuppressivum nach Transplantationen verwendet. Chemisch gesehen handelt es sich um das Nitroamidazolderivat des 6-Mercaptopurins (27). Seine immunsuppressive Potenz (29, 84) wird durch eine Kombination mit niedrigen Dosen Methylprednisolon (58, 73, 146) gesteigert. Tabelle 4 zeigt das bei den Patienten unserer Azathiopringruppe angewendete Basistherapieschema. Dabei handelt es sich aber nur um Richtwerte, da die Dosierung der Transplantatfunktion, dem individuell unterschiedlichen immunsuppressiven Effekt, sowie den Nebenwirkungen angepaßt wurde (53).

Bei Abstoßungskrisen wurde die Immunsuppression mit einer Stoßtherapie von 3 mal 500 mg Methylprednisolon (3) verstärkt. Bei Fortbestehen der Symptomatik wurde ein Zyklus von 7 bis 10 Dosen ALG⁴⁾ entsprechend dem Dosierungsschema von Tabelle 5 angeschlossen (23, 24, 25, 109, 126).

1) Imurek, Deutsche Welcome GmbH

2) Sandimmun, Sandoz AG, Basel, Schweiz

3) Urbason, Höchst AG

4) Pressimmun, Behringwerke

Dieses Schema ist wiederum nur als Anhaltspunkt zu verstehen, da auch hier insbesondere im Hinblick auf Nebenwirkungen (139) Abweichungen notwendig waren.

Zeit	Azathioprin mg/kg KG/die	Methylprednisolon bzw. Prednisolon mg/die bei 70 kg KG
intraoperativ	5	500 Methylpred.
1. - 3. Tag	4 bzw. 2 ⁺	120 Prednisolon
4. + 5. Tag	2,5 - 1,5	80 Prednisolon
6. + 7. Tag	2,5 - 1,5	60 Prednisolon
2. Woche	2,5 - 1,5	40 Prednisolon
3. Woche	2,5 - 1,5	36 Prednisolon
4. Woche	2,5 - 1,5	28 Prednisolon
2. Monat	2,5 - 1,5	16 Prednisolon
3. Monat	2,5 - 1,5	12 Prednisolon
Erhaltungs- zeitraum		12 - 8 Pred.

+ bei Nierensuffizienz

Tabelle 4: Basistherapie nach allogener Nierentransplantation.
Konventionelle Therapie

Tag der Abstoßungskrise	Methylpred. mg/die	ALG mg/kgKG/die
1. - 3. Tag	500 mg	
4. - 10. Tag	250 mg	40 mg
10. - 13. Tag		40 mg

Tabelle 5: Therapie bei akuter Abstoßung nach allo-
gener Nierentransplantation unter Aza-
thioprin und Methylprednisolon als
Basistherapie

2.3.2 Therapieschemata der Cyclosporin-A Gruppe

Cyclosporin-A ist ein zyklisches Polypeptid, bestehend aus 11 Aminosäuren. Seine immunsuppressive Wirkung wurde von Borel et al. (16, 17) beschrieben. Über erste klinische Ergebnisse berichteten Calne et al. 1978 (28). Bei den Patienten unserer Cyclosporin-A Gruppe wurde es mit Methylprednisolon in einer Dosierung, die knapp unter der "Cushing Schwelle" liegt, kombiniert (Tab. 6).

1. Monat:	15 mg/kg KG/die Cy-A	
	+ 8 mg	Methylpred.
2. Monat:	13 mg/kg KG/die Cy-A	
	+ 8 mg	Methylpred.
3. Monat:	11 mg/kg KG/die Cy-A	
	+ 8 mg	Methylpred.
weitere Reduktion bis		
6. Monat:	6 mg/kg KG/die Cy-A	
	+ 8 mg	Methylpred.

Tabelle 6: Basistherapie der Patienten der
Cyclosporin-A Gruppe

In der Cy-A Gruppe wurden drei verschiedene zusätzliche Abstoßungstherapien angewendet. Dazu wurden 3 randomisierte Patientengruppen gebildet. Die erste Gruppe wurde mit einem Kaninchen ALG¹⁾, mit 2.5 mg/kgKG, die zweite Gruppe mit einem Kaninchen ATG²⁾, 4 mg/kgKG und die dritte Gruppe mit einem Pferde ALG³⁾ in einer Dosierung von 25 mg/kgKG behandelt.

1) ALG, Merieux

2) ATG, Fresenius

3) Pressimmun, Behringwerke

Dabei wurde wie folgt verfahren:

1. Abstoßungskrise

1 x 500 mg Methylprednisolon i.v./tgl. über 3 Tage

2. und 3. Abstoßungskrise (bzw. Fortbestehen der 1. und 2. Abstoßungskrise)

1.) 125 mg Methylprednisolon i.v./tgl. über max. 7 Tage

2.) ALG/ATG nach Randomisierung (A,B,C, -Gruppe) über 7 Tage

4. Abstoßungskrise

(bzw. zunehmende Funktionsverschlechterung unter Antiabstoßungs-Therapie bei 2. oder 3. Abstoßungskrise, Kreatinin ≥ 5 mg% = therapierefraktäre Abstoßungskrise)

1.) Konversion von Cy-A auf Imurek + 40 mg Methylprednisolon

2.) ALG/ATG nach Randomisierung über 7 Tage

Tabelle 7: Therapie bei akuter Abstoßung nach allogener Nierentransplantation unter Cyclosporin-A als Basistherapie

2.3.3 Konversionen

Der Therapieplan der Cyclosporin-A Gruppe hatte eine routinemäßige Konversion nach drei Monaten auf Azathioprin vorgesehen. Dies wurde jedoch nur bei 11 Patienten durchgeführt. Alle anderen Patienten dieser Gruppe wurden entsprechend Tabelle 6 behandelt. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist, wurde auch bei sog. therapierefraktären Abstoßungskrisen konvertiert. Dementsprechend wurden die

Patienten von Azathioprin auf Cy-A umgestellt. Wegen einer eventuellen Vermischung der Wirkungen beider Immunsuppressiva während der überlappend durchgeführten Konversionen wurden die Ergebnisse unserer Tests von Beginn einer Umstellung bis 7 Tage danach gesondert behandelt und nicht einer der beiden Basistherapien zugeordnet.

2.3.4 Einteilung der Patienten in Therapiegruppen

Entsprechend den oben dargestellten Therapiekonzepten ergibt sich für unsere Untersuchungen folgende Verteilung der Patienten

Azathioprin: 36 Patienten
(Konversion auf Cy-A: 13 Patienten)

Cyclosporin-A: 62 Patienten
(Konversion auf Azathioprin: 8 Patienten)

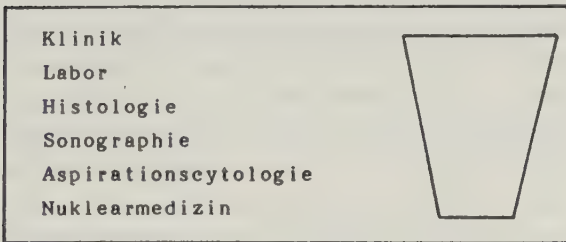
Die Werte von 5 Patienten, die nur mit Cy-A ohne Methylprednisolon im Rahmen einer multizentrischen Studie behandelt wurden, wurden aufgrund zu kleiner Endzahlen in der Auswertung nicht berücksichtigt. Aus dem selben Grund wurden einige nach Gabe von ATG (40,43) erhaltenen Werte nicht ausgewertet. Die beiden unterschiedlichen ALG Gruppen unter Cyclosporin-A Behandlung wurden nicht differenziert, sondern als einheitliche Therapie angesehen.

2.4 Verlaufsbeobachtungen

2.4.1 Abstoßungskrisen

Die Diagnose einer Abstoßungskrise ist nur durch das Zusammenfügen verschiedener Befunde aus unterschiedlichen Untersuchungen möglich. Die folgende Darstellung zeigt die Schwerpunkte der diagnostischen Möglichkeiten.

Abb. 2: Diagnostik nach Nierentransplantation
Versuch einer Wertigkeit unserer "Mosaik-
steine"



Ausschnitt aus: Transplantationszentrum München
1976 - 1982, Hrsg. W. Land, 1982
(100)

Bei unseren Auswertungen waren wir auf eine retrospektive Beurteilung der jeweiligen Befunde angewiesen. Als Abstoßungskrisen wurden die Fälle von in situ Inflammation bewertet, die eine massive Abstoßungstherapie zur Folge hatten. Ein negativer Befund in der Stanzbiopsie oder einer Feinnadelbiopsie führte zum Ausschluß des entsprechenden Wertes auch bei nachfolgender Abstoßungstherapie.

Bei der histologischen Beurteilung wurde eine mittelschwere zelluläre Reaktion und bei den Ergebnissen der Feinnadelaspirationszytologie eine Abstoßung Grad I - II als positiver Befund gewertet.

2.4.2 Virusinfektionen

Die Virusinfektionen durch Viren der Herpes Gruppe wurden durch serologische Untersuchungen nachgewiesen. Andere Infektionen konnten nicht ausgewertet werden. Bei den meisten Patienten wurde jeden Monat eine Basisserologie und bei klinischem Verdacht einige Spezialuntersuchungen durchgeführt. Die Basisserologie setzt sich zusammen aus den Titerbestimmungen der Komplementbindungsreaktionen (KBR) für Herpes Simplex Virus (HSV), Varizellen Zoster Virus (VZV) und Zytomegalie Virus (CMV), sowie der Bestimmung der IgG-Titer gegen das Epstein-Barr Virus (EBV) Capsid Antigen mit Hilfe eines Immunfluoreszenz Testes (VCA-IgG).

Zu den bei Verdacht auf Infektion durchgeführten Untersuchungen gehören ein CMV IgM ELISA Test und ein EBV IgM Immunfluoreszenztest. Die Werte des EBV "early antigen" und des EBV "nuclear Antigen" wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Alle Bestimmungen wurden im Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilian Universität München ausgeführt. Die Angaben der Mitarbeiter dieses Instituts auf den Untersuchungsformularen, die an die Transplantationseinheit des Klinikums Großhadern zurückgingen, dienten als Grundlage der folgenden Einteilung. Als signifikante Veränderungen im Sinne einer manifesten Infektion wurden gewertet (102, 107, 122):

- CMV-IgM Titer $\geq 1:160$
- CMV-IgM Titer $\geq 1:40$ mit Anstieg des KBR Titers
um das Vierfache innerhalb
von zwei Monaten
- EBV-IgM Titer $\geq 1:32$ und Anstieg des IgG Titers
um das Vierfache
- HSV-KBR Titeranstieg um das Vierfache

Bei allen nicht signifikanten aber verdächtigen Reaktionen wurden die Werte weder der Virusgruppe noch der nicht an einer Virusinfektion dieser Art erkrankten Gruppe zugeteilt.

Für eine Zuordnung unserer Werte zu einer dieser Gruppen war also eine möglichst lückenlose Rekonstruktion der Serologie Voraussetzung.

2.5 Auswahl der Patienten

Außer den wenigen Einschränkungen oder Kontraindikationen der Feinnadelbiopsie, wie Infektion des zu biopsierenden Areals oder nicht lokalisierbaren Organs wegen extremer Fettleibigkeit (69) gab es keine besonderen Auswahlkriterien der Patienten, die in das Monitoring aufgenommen wurden. Bei den von den behandelnden Ärzten dazu ausgewählten Patienten wurden jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag routinemäßig Feinnadelbiopsie und Blutentnahme durchgeführt. Bei zehn Patienten wurde während ihres Klinikaufenthaltes mit derselben Regelmäßigkeit nur Tests im peripheren Blut durchgeführt. Auf der anderen Seite wurden viele Feinnadelbiopsien zur Klärung aktueller diagnostischer Probleme gemacht, bei denen nicht gleichzeitig das ganze Programm unserer Tests ausgeführt werden konnte oder bei denen es bei Einzelbestimmungen blieb. Auch zur Untersuchung spezieller Fragen, wie z.B. Wirkungen von Medikamenten wurden ergänzend gezielte Tests gemacht.

3. Material und Methoden

3.1 Monitoring im peripheren Blut

3.1.1 Gewinnung des mononukleären Konzentrats

5 ml venöses Blut wurde am frühen Morgen vor Einnahme von Medikamenten den Patienten abgenommen und mit 50 i.E. Heparin versehen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde es im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Nach Verdünnung mit Hank'scher Lösung¹⁾ (1 Teil Blut auf 1 Teil Hank'scher Lösung) wurden je 5 ml der Blutsuspension auf 3 ml Ficoll - Hypaque Lösung²⁾ der spezifischen Dichte 1.077 g/ml in 10 ml Reagenzgläsern aufgeschichtet. Durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 1200 G, was 2800 Umdrehungen/min. in der Laborzentrifuge "Rontanta/S" der Firma Hettich³⁾ entspricht, wurden die mononukleären Zellen - also im allgemeinen Lymphozyten und Monozyten (15) - als Interphasenring im Dichtegradienten abgetrennt. Dieser Interphasenring befand sich zwischen Ficoll - Hypaque Lösung und dem Gemisch aus Plasma und Hank'scher Lösung, während Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichts den Bodensatz bildeten. Das mononukleäre Konzentrat wurde mit Hilfe von Pasteur Pipetten aufgenommen und in Hanks resuspendiert, dann dreimal mit absteigender

1) Tris - Hank'sche Lösung, pH 7.4, mit Phenolrot, Kliniksapotheke

2) Ficoll - Hypaque Lösung 1.077 g/ml, Kliniksapotheke

3) Firma Andreas Hettich, Postfach 391, 7200 Tuttlingen

Geschwindigkeit bei 1700 U/min, 1500 U/min und 1200 U/min jeweils 10 Minuten gewaschen. Die schließlich gewonnene Zellsuspension wurde auf $1 - 5 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Jeweils 100 μ l dieser Suspension wurden auf 2 ml Reagenzgläser zur Inkubation mit den Antiseren verteilt.

3.1.2 Markierung mit monoklonalen Antikörpern

Es wurde eine sogenannte "indirekte Immunfluoreszenz Methode" angewandt. Dabei bindet in der ersten Phase ein primärer Antikörper an einem Antigen der Zelloberfläche. Ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, bindet in der nächsten Phase an dessen Antigenstrukturen. Der zweite Antikörper ist mit einer Substanz konjugiert, die entweder eine Anfärbung ermöglicht oder wie in unserem Fall zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Damit werden auf den Zellen definierte Antigenstrukturen "indirekt" sichtbar gemacht.

Aus einer großen Anzahl von monoklonalen Antikörpern gegen Membranantigene der Zellen des mononukleären Konzentrats wurden folgende ausgewählt:

OKT 3¹⁾ - Dieser Antikörper bindet selektiv an der überwiegenden Mehrzahl der reifen Thymozyten und reifen T-Lymphozyten (98, 130). Es binden etwa $2 - 4 \times 10^4$ Antikörpermoleküle an der Oberfläche einer Zelle (167). Die Bindungsstelle ist an dem Mechanismus der Antigenerkennung durch die T-Zelle beteiligt (35, 165).

1) Warenbezeichnung der Firma Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan, New Jersey 08869 USA. Die Antikörper werden unter der Bezeichnung Orthoclone angeboten.

- OKT 4¹⁾ - Dieser Antikörper markiert eine Untergruppe der T-Zellen. Das entsprechende Antigen gehört zum HLA-DR Antigenrezeptor dieser Zellen (61, 96). Sie sind zur Entstehung einer Immunantwort in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) erforderlich (131, 132). Auch die Aktivität von Suppressorzellen ist von ihrer Anwesenheit abhängig (111, 155). Des Weiteren induzieren die OKT 4 positiven Zellen die Transformation der B-Zellen zu Plasmazellen und deren IgG Produktion (61, 132, 136). Zusammenfassend bezeichnet man sie deshalb als Helferzellen.
- OKT 8¹⁾ - Zwei Hauptfunktionen kennzeichnen diese T-Zell Subpopulation. Erstens werden Zellen mit zytotoxischer Aktivität markiert (134, 135). Zweitens gehören die Suppressorzellen zu dieser Untergruppe, deren Funktion sich sowohl auf T-T Zell als auch auf T-B Zell Interaktionen bezieht.
- OKM 1¹⁾ - Etwa 80% der adhärenenten Leukozyten des peripheren Blutes und etwa 20% der nicht adhärenenten Zellen werden von diesem Antikörper markiert (22). Bei den adhärenenten Zellen handelt es sich um Monozyten und Granulozyten, während die nicht adhärenenten aber OKM 1 positiven Zellen zu den sog. Nullzellen (47, 118) gehören. Das Antigen ist somit auf den Zellen der Myeloidlinie zu finden (90, 160).

1) Warenbezeichnung der Firma Ortho Pharmac. Corp.

MoAk 5202¹⁾ - Dieser Antikörper ist gegen eine Komponente des HLA-DR Antigenkomplexes gerichtet, der mit den Ia Antigenen der Maus kreuzreagiert (127). Diese Ia ähnlichen humanen Antigene befinden sich auf den meisten B-Zellen (147) und einigen Untergruppen der Monozyten, Makrophagen und Nullzellen (2, 133). Auch eine geringe Anzahl von ruhenden T-Zellen (62), aber etwa 60% der aktivierten T-Zellen werden markiert (133, 152).

Alle aufgeführten Antikörper wurden in lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden in 1 ml Aqua dest. aufgelöst und in 0,9% Kochsalzlösung 1:100 verdünnt. Jeweils 30 µl davon wurden zu 100 µl der mononukleären Zellsuspension zugesetzt und eine halbe Stunde bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. In diesem Bearbeitungsstadium können die Zellen auch bis zu 12 Stunden gelagert werden.

Durch Aufschwemmen in 2 ml NaCl-Lösung und Zentrifugieren wurde die Zellsuspension gewaschen und der Überstand wieder bis auf 100 µl abgehoben. Da alle primären Antikörper aus klonierten Mäuszellen stammen (8) und der IgG-Klasse zugehören, konnten alle mit demselben sekundären Antikörper markiert werden. Wir verwendeten einen Fluoreszeinkonjugierten anti-Maus-IgG Antikörper²⁾. Die Antikörperlösung wurde 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt und davon wurden wieder 30 µl zu der Zellsuspension

1) Warenbezeichnung der Firma "Oy Medix Ab" PB 819
SF 00101 Helsinki 10, Finnland
Cat. No 5202 M 101

2) Goat Anti-Mouse IgG-FITC, Code No. 6250
Tago Inc. Burlingame, CA 94010 USA

zur halbstündigen Inkubation bei 4°C getropft. Nach erneutem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper wurde der Überstand bis auf etwa 30 - 50 µl abgehoben.

Zum Ausschluß von unspezifischer Markierung durch den sekundären Antikörper wurden immer auch Zellsuspensionen ohne Zugabe von primären nur mit sekundären Antikörpern angesetzt.

3.1.3 Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Um eine Schwächung der Fluoreszenz zu verhindern (124) wurde sofort mit dem Auszählen der Zellen begonnen. Dazu wird ein kleiner Tropfen der Zellsuspension auf ein Deckgläschen aufgebracht, das dann so auf einen Objektträger gelegt wird, daß es auf einem dünnen Flüssigkeitsfilm schwimmt. Unter einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop¹⁾ wurden im Durchlicht bei 400facher Vergrößerung 200 Zellen ausgezählt. Bei Verwendung einer Halogenlampe und Zwischenschaltung von Filtern²⁾ erhält man im Dunkelfeld des Ölinversionskondensors einen schwarzen Hintergrund, leuchtend rote Zellen und eine apfelgrüne Fluoreszenz.

1) Zeiss-Universal-Fotomikroskop, Carl Zeiss, 7082 Oberkochen

Objektive: Ph 2, Plan 40/0.65; 160/0.17

Neofluar 40/0.75; 160/0.17

2) Halogenleuchte 12 V 100 Watt

Zeiss-Kondensor 1.2/1.4

KP 500 Kurzpaßfilter; BG 38 Rotfilter

Die positiven Zellen sind getüpfelt und häufig durch das sog. "capping" besonders deutlich markiert. Darunter versteht man die Ansammlung der Oberflächenantigen-Antikörperkomplexe auf einem Zellpol, wodurch die Fluoreszenzmoleküle verdichtet und die Helligkeit der Fluoreszenz verstärkt wird (19, 88).

3.2 Monitoring in situ

3.2.1 Feinnadelaspirationszytologie

3.2.1.1 Feinnadelbiopsie

Zur Durchführung der Feinnadelbiopsie wird unter sterilen Cautelen eine Spinalnadel¹⁾ nach Palpation des oberen Nierenpols in das Rindenparenchym der Transplantatsniere vorgeschoben. Pulssynchrone Ausschläge der Nadel zeigen die korrekte Platzierung an.

Eine 20 ml Einmalspritze, in die 5 ml heparinisiertes oder mit EDTA versehenes Kulturmedium²⁾ aufgezogen wurde, wird der Nadel aufgesetzt und diese dann unter Sog und leichtem Vibrieren zurückgezogen. Um einen gleichmäßigen und starken Sog erzeugen zu können, empfiehlt es sich, die Spritze in einen Camecongriff³⁾ einzuspannen. Die Biopsienadel wird anschließend mehrmals in der

1) Spinal Needle, B-D & Luer-Lok, Becton,

Dickinson and Company, Größe 90-7, 22G 3 1/2, Rutherford, N.J. USA

2) RPMI-1640 Medium mit 1 ml 1 M Hepespuuffer pro Liter. Bei Fresenius/Martinsried steril in 5 ml Fläschchen abgefüllt.

3) Camecongriff, Camecon AB, 8305-Täby, Schweden

Kanülenhülse gespült, um auch das Material zu gewinnen, das in ihr haftet. Diese Methode führt zur Aspiration von ca. 10 µl repräsentativen Zellmaterials (69, 70).

Eine Kontamination mit ebenfalls aspiriertem Blut ist bei der starken Durchblutung des Organs nahezu immer gegeben (93).

3.2.1.2 Material zur Zytologie des peripheren Blutes

Ein Tropfen peripheren Blutes aus der Fingerbeere wird in eine Einmalspritze aufgenommen, die 2 ml des unter 2.1.1 erwähnten Kulturmediums enthält.

3.2.1.3 Herstellung der Zytozentrifugenpräparate

Da die Zellsuspensionen eine unterschiedliche Zelldichte aufweisen, müssen sie mit Hilfe einer Leukozytenzählkammer oder eines Coulter Counters auf etwa 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt werden. Etwa 200 µl jeder Probe werden in die Küvetten einer Zentrifuge¹⁾ gegeben. Nach 5 Minuten zentrifugieren bei 500 U/min - was 300 G entspricht - ist das Zellmaterial in einer 0.2 cm² großen, kreisförmigen Fläche auf die eingespannten Objektträger aufgetragen. Bei optimaler Dichte der Präparate liegen die Zellen eng nebeneinander, ohne sich zu überdecken (51). Es empfiehlt sich, immer mehrere Präparate einer Probe in etwas variierenden Verdünnungen herzustellen. Bei diesem Vorgehen verbraucht man durchschnitt-

1) Zytozentrifuge mit Küvetten, Cytospin II,
Shandon, Labortechnik GmbH, Frankfurt

lich 500 µl des Aspirates. Falls sehr wenig Material suspendiert ist, muß es durch sanfte Zentrifugation zum Erreichen der nötigen Zelldichte soweit konzentriert werden, daß es bei diesem ersten Arbeitsgang schon aufgebraucht wird. In den überwiegenden Fällen jedoch bleiben 4 - 4.5 ml des Feinnadelaspirates zur weiteren Verwendung übrig.

3.2.1.4 Färbung und Differenzierung

Nach Lufttrocknung werden die Zytozentrifugenpräparate des aspirierten Materials und des peripheren Blutes nach Pappenheim gefärbt (11, 74). Dies ermöglicht eine gute morphologische Beurteilung sowohl der Nierengewebszellen als auch der infiltrierenden und peripheren Leukozyten (69, 170). Als Nierengewebszellen können proximale und distale Tubuluszellen und Endothelzellen, vereinzelt auch andere Zellen des glomerulären Verbandes unter einem Universallichtmikroskop¹⁾ differenziert werden. Sie werden nach Anzahl, Größe der auftretenden Verbände und Verteilung der unterschiedlichen Zellarten beschrieben. Eine genaue Analyse der intrazellulären Veränderungen, wie Vakuolisierung, Basophilie des Zytoplasmas, verschiedene Granulierungen und Einschlüsse, Karyolyse etc., aber auch Veränderungen der Zellform und Zellgröße erlaubt Rückschlüsse auf pathogenetische Mechanismen und deren Ätiologie (71, 76).

In dieser Arbeit steht die Differenzierung des Infiltrats im Vordergrund. Es wurden jeweils 2 x 100 Leukozyten ausgezählt und durch Eintippen in ein Zählgerät²⁾ registriert.

1) Zeiss-Mikroskop: Standard

2) Zählapparat, Leucodiff 600, Instrumentation Laboratory, Boskamp GmbH

Unter Berücksichtigung hämatologischer und zytologischer Kriterien (82, 141, 161, 170) wurden folgende Zellen lichtmikroskopisch unterschieden:

Myeloische Reihe

Neutrophile, eosinophile, basophile segmentkernige Granulozyten

Neutrophile, eosinophile, basophile stabkernige Granulozyten

Juvenile (Vorstufen der myeloischen Reihe wie Promyelozyten und Metamyelozyten; Vorstufen der roten Reihe wie Normoblasten oder Erythroblasten wurden gesondert erwähnt)

Monozyten

Makrophagen

Lymphatische Reihe

Lymphozyten: große und kleine Lymphozyten, "large granular lymphocytes" und aktivierte Lymphozyten wurden einheitlich als Lymphozyten bewertet.

Plasmazellen

Lymphoblasten

Plasmablasten

Tabelle 8: Leukozytäre Subpopulation die bei der lichtmikroskopischen Beurteilung des Infiltrats einer transplantierten Niere im Rahmen der Feinnadelaspirationszytologie differenziert wurden.

3.2.1.5 Kriterien der Beurteilung

Als Sicherheit dafür, daß es sich um Aspirat aus der Niere handelt, genügt das Vorhandensein von Nierengewebszellen.

Die Beurteilung der Infiltration kann aber durch verschieden große Beimischung von Blut aus den Nierengefäßen stark verfälscht werden. Deshalb sollten mindestens 7 - 10 Nierengewebszellen pro 100 Leukozyten vorhanden sein. Dieses Verhältnis zeigt in der Regel ein repräsentatives Aspirat an (94).

Die prozentualen Anteile der lichtmikroskopisch differenzierten leukozytären Subpopulationen des peripheren Blutes und des Feinnadelaspirates wurden tabellarisch festgehalten. Durch Subtraktion der Zellpopulationen des peripheren Blutes von den entsprechenden Zellen des Aspirats errechnet sich das sogenannte "increment" als Zuwachsrates der einzelnen Zellpopulationen in der Feinnadelaspirationszytologie. Damit wird der Unterschied der Zusammensetzung des Infiltrats vom peripheren Blut ermittelt. Unter der Annahme einer selektiven Erhöhung bestimmter Subpopulationen als Ausdruck der immunologischen zellulären Abstoßungsreaktion läßt sich mit dieser Methode auch eine semiquantitative Aussage über das Ausmaß der Infiltration machen (170).

Experimentelle Analysen der zellulären Abstoßungsreaktionen (67, 68, 168, 169) und eine retrospektive Auswertung von über 1000 Feinnadelaspiraten zeigten zu Beginn der Entwicklung der Transplantataspirationszytologie einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftauchen bestimmter Zelltypen und der Entwicklung und der Prognose einer Abstoßungskrise. Aus diesen Beobachtungen leitete man eine Gewichtung der Zellen als Ausdruck ihrer immuno-

gischen Potenz ab. Die Multiplikation des ermittelten "increments" einer Zellsorte mit einem dieser Gewichtung entsprechenden Faktor ergibt das "corrected increment" (70). Die semiquantitative Aussage des increments wird somit um eine qualitative Abschätzung der Reaktionslage erweitert.

Lymphoblast	x	1,0
Plasmablast	x	1,0
Lymphozyt	x	0,1
Monozyt	x	0,2
Makrophage	x	1,0

Tabelle 9: Zellen die bei der Berechnung des corrected increments bewertet wurden und deren Multiplikationsfaktoren entsprechend ihrer geschätzten Bedeutung im Abstoßungsprozess

Zur Beurteilung der Stärke der Inflammation des Transplantats werden in der vorliegenden Arbeit drei Abstufungen des "corrected increments" angegeben. Diese Einteilung wurde aus einer Auswertung aller in diesem Zusammenhang bearbeiteten Feinnadelaspirate abgeleitet (94). Die Stufe 0-1 besagt, daß nicht sicher eine Inflammation nachgewiesen werden kann. Die im Aspirat vorhandenen leukozytären Zellen entsprechen einer Kontamination durch peripheres Blut. Bei der nächsten Stufe mit einem "corrected increment" von 1-2.5 liegt eine leichte, entweder beginnende oder abflauende

Inflammation des Organs vor. Die letzte Abstufung der Einteilung der Aspiate mit einem "corrected increment" von über 2.5 entspricht einer voll ausgeprägten Infiltration des Transplantats mit überwiegend mononukleären Zellen (78, 79).

3.2.2 Markierung mit monoklonalen Antikörpern

Zur Markierung mit monoklonalen Antikörpern wurde wieder die indirekte Immunfluoreszenztechnik mit denselben primären und sekundären Antikörpern wie bei der Markierung des mononukleären Konzentrats verwendet.

Nach Herstellung der Zytozentrifugenpräparate wird der Rest der Zellsuspension des Aspirats bei 1200 U/min in der Laborzentrifuge "Rontanda/S" abzentrifugiert. Der Überstand wird je nach Zelldichte auf etwa 400 - 600 µl abgehoben und das so konzentrierte Aspirat zu je 100 µl auf 2 ml Reagenzröhrchen verteilt. Dies reicht für 3 - 5 verschiedene Antikörpermarkierungen und eine Kontrolle. Nach Zugabe von 30 µl der jeweiligen monoklonalen Antiseren werden die Zellsuspensionen vorsichtig geschüttelt und 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Die Inkubation bei Kälte ist in diesem Fall besonders wichtig, da im Gegensatz zum mononukleären Konzentrat der Anteil der Erythrozyten sehr hoch ist. Der Metabolismus der Erythrozyten bei Zimmertemperatur führt zur starken Übersäuerung der Zellsuspension und damit zur Schädigung der Leukozyten, die dann die nachfolgenden Prozeduren nicht mehr überstehen.

Als nächstes werden die Zellen einmal bei 1200 U/min gewaschen, 30 µl des "Goat anti mouse" Antikörpers hinzugegeben und wieder eine halbe Stunde

bei 4°C inkubiert. Die Kontrollsuspension durchläuft abgesehen von der Zugabe des primären Antikörpers wieder alle Arbeitsgänge in identischer Weise.

Im letzten Arbeitsgang werden die Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml Aqua dest. und Aufschütteln lysiert. Nach 30 Sekunden wird 1 ml 1.8% NaCl Lösung dazugemischt und somit wieder eine isotonische Lösung erzeugt. Nach Abzentrifugieren und Abheben des Überstandes auf 50 µl muß sofort mit der Auszählung begonnen werden, da die Leukozyten sich bei weiterer Lagerung nach der Lyse der Erythrozyten ebenfalls schnell auflösen. In manchen Fällen ist eine zweimalige Lyse der Erythrozyten erforderlich.

3.2.3 Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Der prozentuale Anteil der markierten Zellen wurde wiederum durch Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Im Gegensatz zum mononukleären Konzentrat waren in dieser Suspension jedoch auch Granulozyten in erheblichem Maße enthalten. Deshalb sind die positiven Zellen als Prozent aller Leukozyten zu verstehen.

3.3. Statistische Berechnungen

Die nach den einzelnen Gesichtspunkten zusammengestellten Wertegruppen wurden mit dem sog. David-Quotienten (145) innerhalb der 10% Grenzen auf Normalverteilung geprüft. Im positiven Fall wurde der Vergleich der Stichproben mit dem zweiseitigen

t-Test für unabhängige Zufallsstichproben mit unbekannten und möglicherweise ungleichen Zufallsstichproben mit unbekannten und möglicherweise ungleichen Varianzen durchgeführt (50, 145). Für nicht normalverteilte Gruppen wurde der U-Test von Wilcoxon, Mann und Withney (145) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen im peripheren Blut

4.1.1 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats von Normalpersonen

Zur Bestimmung der lymphozytären Subpopulationen im mononukleären Konzentrat von Normalpersonen wurde Blut von 5 freiwilligen Spendern verwendet. Dabei handelt es sich um 4 männliche und 1 weibliche Person, die im selben Labor tätig waren. Die Blutabnahme erfolgte immer morgens zur selben Zeit.

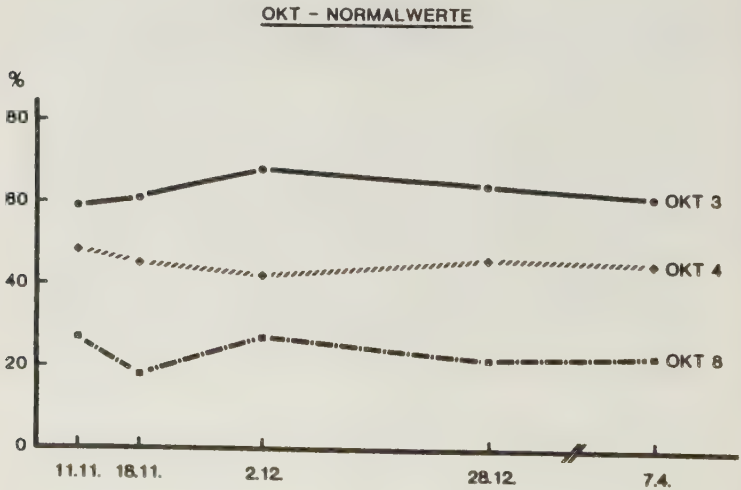


Abb.3: Verlauf der gesamt T-Zell (OKT 3), der Helfer (OKT 4) und der Killer/Suppressor (OKT 8) Subpopulation bei einer Normalperson im Zeitraum von 5 Monaten

Es wurden bei den Bestimmungen der einzelnen Personen keine festen Abstände eingehalten, aber insgesamt wurde etwa alle zwei Wochen eine Normalwertbestimmung durchgeführt. Die Werte der verschiedenen Subpopulationen waren bei den einzelnen Personen relativ konstant, wie dies die Abbildung 3 für die T-Zellwerte einer der Normalpersonen zeigt.

Besonders konstant waren die Werte für OKT 4, während die Werte für OKT 8 stärker variierten. Die interindividuellen Unterschiede waren ebenfalls gering. Trotzdem deutete sich bei manchen Personen eine Tendenz zu eher niedrigen, bei anderen zu höheren Werten an.

	OKT 3	OKT 4	OKT 8	n
S.J.	66.3 $\pm$ 1.2	44.3 $\pm$ 2.4	27.5 $\pm$ 3.6	6
K.C.	59.3 $\pm$ 4.8	40.4 $\pm$ 3.7	23.3 $\pm$ 3.9	6

Tab.10: Gegenüberstellung der Werte der T-Zell Subpopulationen zweier Normalpersonen. Der Unterschied der Werte für OKT 3 ist mit $p \leq 0.01$ signifikant (Test nach Wilcoxon).

Eine Zusammenfassung aller 20 bei Normalpersonen erhaltenen Werte ergibt für OKT 4 einen Mittelwert von 41.5% mit einer Standardabweichung von 3.5%. OKT 8 liegt bei $24.3\% \pm 3.6\%$, OKT 3 bei $60.3\% \pm 4.9\%$. Etwas darüber liegt die Summe aus OKT 4 plus OKT 8 mit $65.7\% \pm 5.1\%$. Da der monoklonale Antikörper gegen B-Zellen MoAk 5202 erst gegen Ende der Untersuchungen zur Verfügung stand, liegen nur 9 Werte für diese Subpopulation vor. Es ergibt

sich ein Mittelwert von 11.8% mit einer Standardabweichung von 3.4%. Ähnliches gilt für OKM 1. 6 Werte ergeben $16.8\% \pm 3.8\%$. In 5 Fällen wurden alle bisher aufgeführten monoklonalen Antikörper bestimmt. Die Summe aus OKT 4, OKT 8, MoAk 5202 und OKM 1 ergibt $97.4\% \pm 7.2\%$.

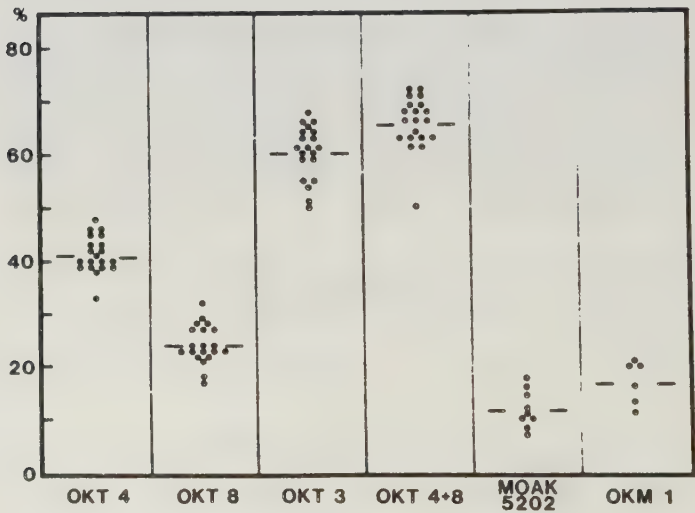


Abb.4: Übersicht der bei 5 Normalpersonen bestimmten Werte der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats

4.1.2 Subpopulationen des mononukleären Konzen- trats unter Immunsuppression bei negativer Virusserologie

4.1.2.1 Kontrollgruppen

Die Werte der Kontrollgruppen sollen eine möglichst reine Basistherapie ohne Beeinflussung durch später zu untersuchende Parameter darstellen. Die entsprechenden Werte wurden wie folgt charakterisiert:

- a) Es durften keine serologischen Anhaltspunkte für eine Virusinfektion bestehen.
- b) Die Werte mußten mindestens 7 Tage vor einer Abstoßungskrise bestimmt worden sein.
- c) Entsprechend mußten mindestens 7 Tage nach einer zusätzlichen Abstoßungstherapie vergangen sein.
- d) Bestimmungen, die unter Cimetidin (Tagamet^R) Gabe durchgeführt worden waren, wurden ausgeschlossen.

Diesen Bedingungen entsprachen bei den T-Zell Subpopulationen 15 Werte von 7 Patienten unter Azathioprintherapie. Unter Cyclosporin-A waren es 43 Werte von 20 Patienten. Die Antikörper 5202 und OKM 1 sind nur in der Cyclosporin-A Gruppe mit 40 bzw. 27 Werten vertreten. Eine Übersicht der Werte dieser zwei Kontrollgruppen zeigen die Abbildungen 5 und 6. Bis auf OKT 4 waren unter Azathioprinbehandlung alle T-Zell Werte im Vergleich zu den Normalwerten signifikant erniedrigt. Unter Cyclosporin-A Therapie war der Anteil der T-Zell Subpopulationen noch deutlicher vermindert. Der prozentuale Anteil der OKM 1 positiven Zellen dieser Gruppe war dementsprechend erhöht. Nur die Werte

des MoAk 5202 waren im Vergleich zu den Normalwerten unverändert.

Der Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander ergibt nur für OKT 4 eine signifikante Erniedrigung der Werte in der Cyclosporin-A Gruppe gegenüber der Azathioprin Gruppe ($p \leq 0.05$).

Dieser verhältnismäßig höhere Anteil der T 4+ Zellen unter Azathioprin spiegelt sich auch in der Berechnung des Verhältnisses von T 4/T 8 wieder. Die Azathioprin Kontrollgruppe unterscheidet sich bei der Berechnung dieses Verhältnisses sowohl

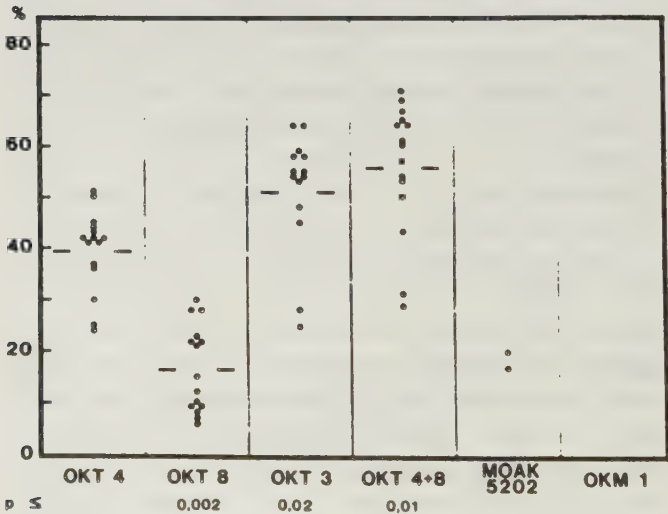


Abb. 5: Subpopulationen des mononukleären Konzentrats der Azathioprin Kontrollgruppe. Die angegebenen Signifikanzschranken (t-Tests) gelten für den Vergleich mit den entsprechenden Normalwerten (für OKT 8 Wilcoxon Test).

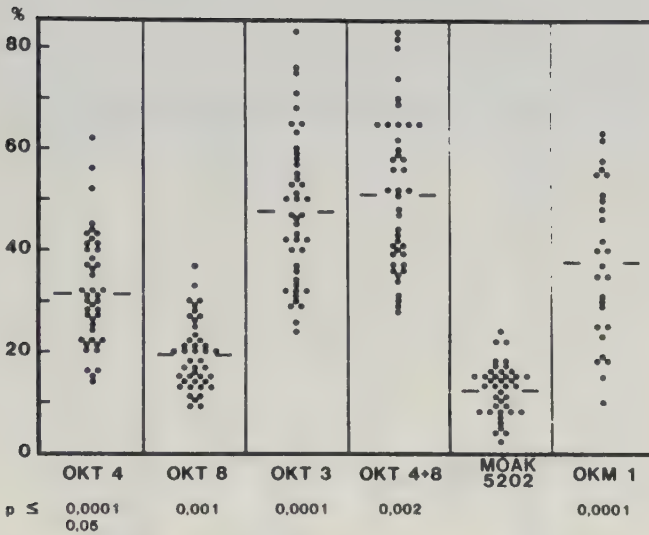


Abb. 6: Subpopulationen der Cyclosporin-A Kontrollgruppe. Die Signifikanzschranken gelten für den Vergleich mit Normalwerten bzw. bei OKT 4 auch mit der Azathioprin Kontrollgruppe (OKT 4+8 Wilcoxon Test, sonst t-Tests)

von der Normalpopulation als auch von der Cyclosporin Kontrollgruppe mit einem durchschnittlichem Wert von 3.10 ± 1.47 gegenüber 1.75 ± 0.29 bzw. 1.82 ± 0.8 . Wie Abb. 7 zeigt, streuen die Werte der Azathiopringruppe praktisch gleichmäßig über den gesamten Verteilungsraum von 1.0 bis 5.3, während die Werte unter Cyclosporin-A stärker um den Mittelwert akkumuliert sind.

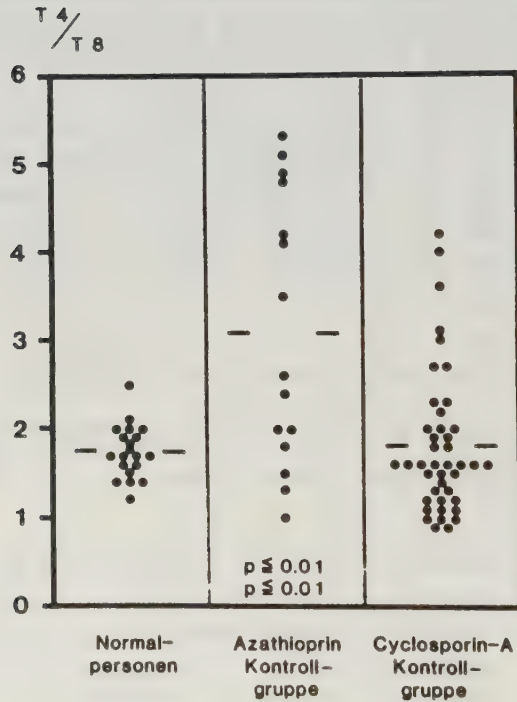


Abb. 7: Vergleich der Verhältnisse $T4/T8$ der Normalwerte und der Werte der beiden Basistherapiegruppen. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich der Azathiopringruppe mit den Normalwerten und mit der Cyclosporin-A Gruppe (beide Wilcoxon Tests)

4.1.2.2 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats vor Abstoßungskrisen

Eine Bestimmung der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats wurde in neun Fällen an mindestens zwei Tagen im Zeitraum von 14 Tagen vor einer Abstoßungskrise durchgeführt.

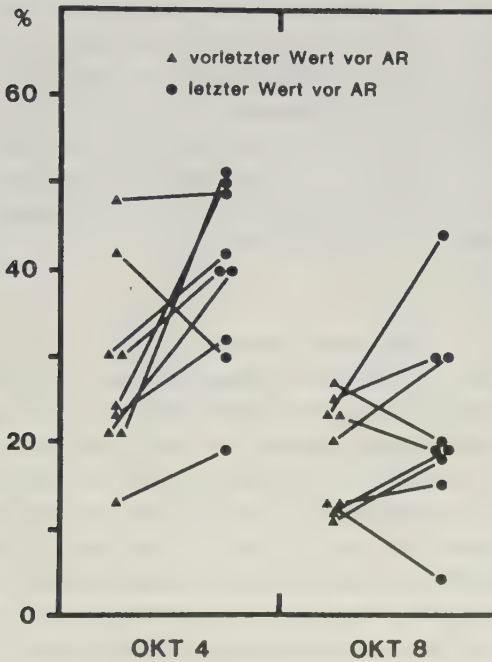


Abb. 8: Vorletzter und letzter Wert der OKT 4 bzw. OKT 8 markierten Zellen im mononukleären Konzentrat vor Abstoßungskrisen. Die vorletzten Werte wurden 5.3 ± 2.9 Tage vor den letzten Werten und diese 1.0 ± 1.4 Tage vor Therapiebeginn bestimmt.

Abbildung 8 zeigt einen deutlichen Anstieg der T 4+ Zellen vor dem Einsetzen der Abstoßungstherapie in den meisten Fällen. Bei den T 8+ Zellen konnte keine eindeutige Tendenz festgestellt werden.

Die Berechnung des T 4/T 8 Verhältnisses ergibt eine nicht signifikante Steigerung von 1.64 ± 0.8 bei den vorletzten Werten auf 2.17 ± 1.02 bei den letzten Werten. Die Abstoßungskrisen wurden dem Abschnitt 2.4.1. entsprechend definiert. In sechs Fällen wurde die klinische Diagnose durch eine eindeutige zelluläre Reaktion im histologischen bzw. zytologischen Präparat bestätigt. Eine besondere Konstellation kann für den einen absinkenden OKT 4 Wert nicht festgestellt werden. Auch hier lag ein eindeutiger Befund der Feinnadelaspiration und eine massive Abstoßungsbehandlung im Anschluß vor.

Insgesamt wurden unter Azathioprin Basistherapie bei 14 Patienten 15 Bestimmungen und unter Cyclosporin-A Basistherapie bei 11 Patienten 11 Bestimmungen der Subpopulationen im Zeitraum von 0.5 ± 0.8 bzw. 0.5 ± 1.2 Tagen vor Beginn der Abstoßungstherapie ausgewertet. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen ergibt sich bei keiner der in Tabelle 11 aufgeführten T-Zell Subpopulationen eine signifikante Veränderung. Das Verhältnis von T 4/T 8 ist in der Azathiopringruppe vor Beginn der Abstoßungstherapie zwar verringert, aber aufgrund der weiten Streuung der Werte nicht signifikant. In der Cyclosporin-A Gruppe wurde auch der monoklonale Antikörper 5202 verwendet. Der Durchschnitt aus 9 Einzelwerten ergibt vor Abstoßungsreaktionen $9.8\% \pm 3.3\%$, während der Durchschnitt der Kontrollgruppe bei $12.3\% \pm 4.8\%$ liegt.

Durchschnittswerte der pos. Zellen in %				
	n	OKT 3	OKT 4	OKT 8
Azathioprin				
Kontrolle	15	51.4 ± 11.3	39.5 ± 7.7	16.5 ± 8.4
vor AR	15	52.1 ± 17.6	34.5 ± 11.0	20.5 ± 9.5
Cyclosporin-A				
Kontrolle	42	47.0 ± 13.8	31.9 ± 10.9	19.3 ± 6.8
vor AR	11	48.7 ± 14.4	34.7 ± 11.0	20.6 ± 7.1

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Durchschnittswerte der T-Zell Subpopulationen der Kontrollgruppen und der Werte vor Abstoßungsreaktionen (AR) in den beiden Basistherapiegruppen. Keine signifikanten Veränderungen.

Unter Azathioprinbehandlung wurden 10 der 15 Abstoßungskrisen durch die Ergebnisse einer Stanzbiopsie oder einer Feinnadelbiopsie bestätigt. In der Cyclosporin-A Gruppe waren es 8 der 11 beschriebenen Fälle.

4.1.2.3 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats unter zusätzlicher Abstoßungstherapie

Unter Azathioprin Basistherapie konnten bei 5 Patienten die T-Zell Subpopulationen im Verlauf einer ALG Therapie ausgewertet werden.

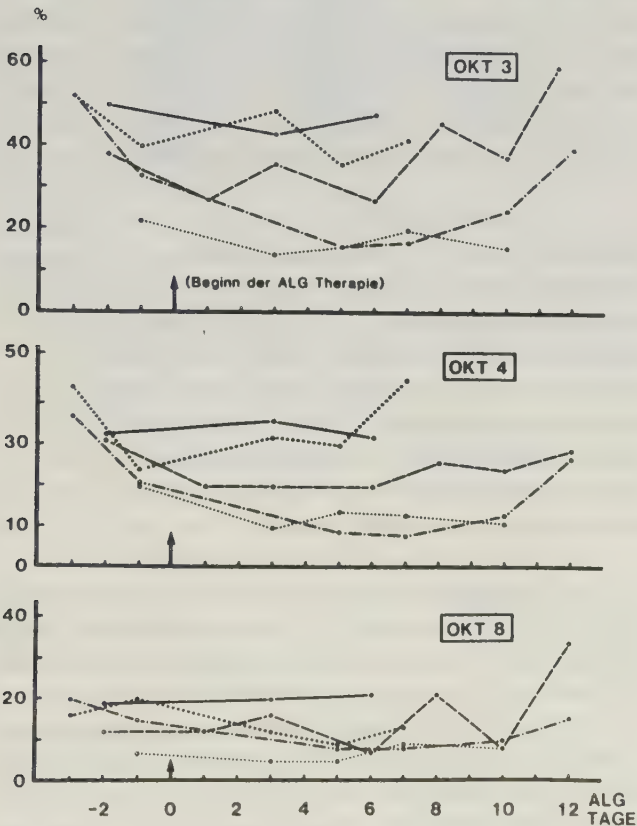


Abb. 9: Verlauf der T-Zell Subpopulationen unter ALG Therapie bei Azathioprin Basistherapie und zusätzlicher hochdosierter Methylprednisolongabe

4 dieser Patienten waren vor Beginn der ALG Zyklen bereits mit 3 mal 500 mg Methylprednisolon vorbehandelt. In allen Fällen wurde die Therapie zu Beginn der ALG Zyklen mit weiteren Methylprednisolongaben ergänzt. Wie Abbildung 9 zeigt, sind in den einzelnen Subpopulationen keine eindeutigen Tendenzen festzustellen. In zwei Verläufen folgt einer anfänglichen Verminderung der T 3+ Zellen ein Anstieg bis etwa zum Ausgangspunkt noch während ALG Gabe. Die anderen drei Verläufe bieten bei dieser Subpopulation nur geringe Schwankungen. Ähnlich verhalten sich die T 4+ Zellen, während die OKT 8 markierten Zellen zum Teil vollkommen unverändert in ihrem prozentuellen Anteil bleiben.

Bei der Zusammenfassung aller unter zusätzlicher Abstoßungstherapie erhaltenen Werte mit Azathioprinbasistherapie wurden zwei Gruppen gebildet. Die Werte der ersten Gruppe wurden ein oder zwei Tage nach Gabe von 3 mal 500 mg Methylprednisolon bestimmt. In der zweiten Gruppe wurden die Werte nach wenigstens 3 bzw. im Durchschnitt 6.4 ± 4 Tage nach Applikation von ALG ermittelt. Bei 19 dieser 35 Werte wurden gleichzeitig hohe Dosen Methylprednisolon verabreicht.

Im Vergleich zur Azathioprin Kontrollgruppe fallen die T 3+ Zellen von $51.4\% \pm 11.3\%$ auf $37.3\% \pm 14.0\%$ nach ALG Gabe ab. Der Wert für OKT 4 fällt unter derselben Zusatztherapie von $39.5\% \pm 7.7\%$ auf $25.0\% \pm 11.5\%$. Die Veränderungen in den Gruppen nach alleiniger Methylprednisolongabe sind nicht signifikant. Die Werte für OKT 8 blieben in beiden Fällen nahezu unverändert (Abb. 10).

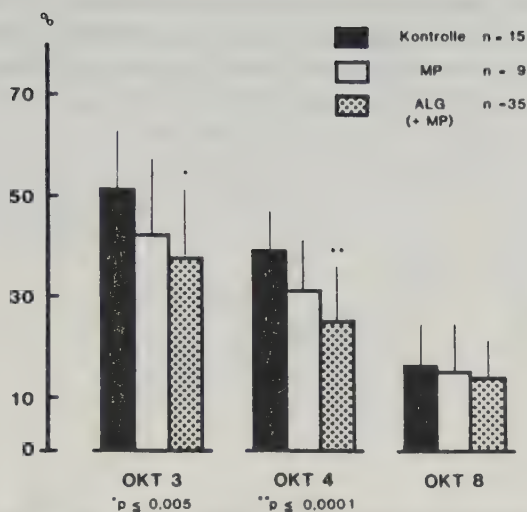


Abb. 10: Vergleich der beiden Abstoßungstherapieformen mit der Kontrollgruppe unter Azathioprin Basistherapie. Die Werte der Methylprednisolongruppe wurden nach 3 mal 500 mg Methylprednisolon (MP) und die der ALG Gruppe nach 6.4 ± 4.0 ALG Tagen bestimmt. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe (beide t-Tests)

Unter Cyclosporin-A Basistherapie konnten Einzelverläufe bei Abstoßungstherapie mit 3 mal 500 mg Methylprednisolon zusammengestellt werden. Abbildung 11 zeigt einen Abfall der T 3+ und T 4+ Zellen in 6 dieser Fälle, während in den anderen 2 Fällen ein Anstieg zu sehen ist. Bei den Patienten mit abfallenden Werten unter hochdosiertem Methylprednisolon wurden 4 bald darauf entlassen bzw. nicht mehr auf Abstoßung weiterbehandelt. Bei den beiden anderen Patienten mußten weitere Therapie-

zyklen angeschlossen werden. Von den Patienten mit steigenden Werten wurde je einer entlassen und einer weiterbehandelt. Die T 8+ Zellen zeigen keine verwertbaren Veränderungen.

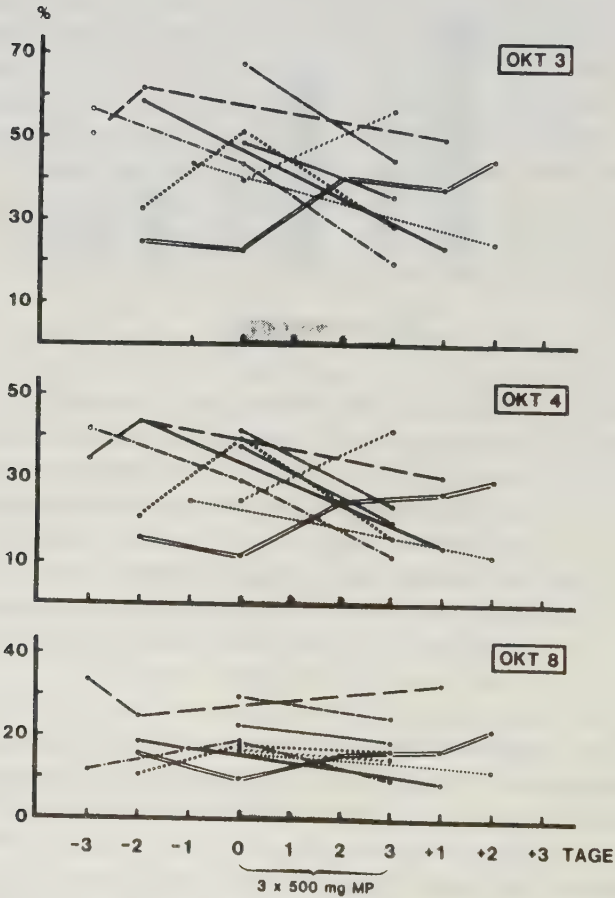


Abb. 11: 8 Einzelverläufe der T-Zell Subpopulationen unter Abstoßungstherapie mit 3 mal 500 mg Methylprednisolon (MP) bei Cyclosporin-A Basistherapie

In der Zusammenfassung wurden wieder eine Gruppe nach 3 mal 500 mg Methylprednisolon und eine Gruppe nach mindestens 3 bzw. durchschnittlich 5.6 ± 1.8 ALG Tagen mit der Cyclosporin-A Kontrollgruppe verglichen. In der ALG Gruppe wurden 2 Patienten zusätzlich mit Methylprednisolon behandelt. Es ergab sich keine signifikante Veränderung.

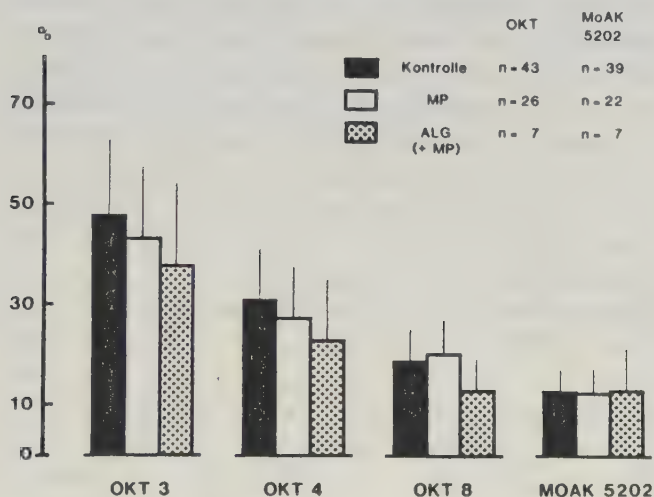


Abb. 12: Vergleich zwischen den beiden Gruppen mit zusätzlicher Abstoßungstherapie und der Kontrollgruppe bei Cyclosporin-A Basistherapie. Die Werte der Methylprednisolongruppe wurden nach 3 mal 500 mg Methylprednisolon (MP) und die der ALG Gruppe nach 5.9 ± 1.8 ALG Tagen bestimmt.

Die unter Cyclosporin-A bestimmten Werte der mit dem monoklonalen Antikörper 5202 markierten Zellen blieben nach beiden Zusatztherapien unverändert (Abb. 12).

4.1.3 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe

4.1.3.1 Epstein-Barr Virus Infektionen

Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes wurden bei zwei Patienten Epstein-Barr Virus Infektionen mit den unter Abschnitt 2.4.4. festgelegten serologischen Titeranstiegen nachgewiesen. Bei einem dieser Patienten konnten im postoperativen Verlauf der T-Zell Subpopulationen auffallende Veränderungen nachgewiesen werden. Vier Tage nach Abnahme

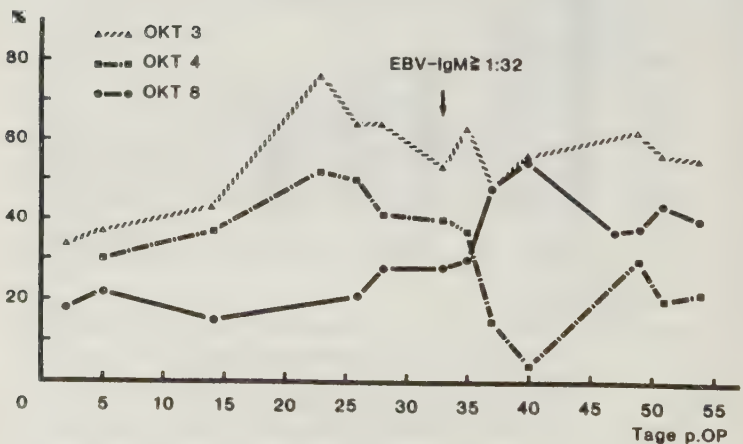


Abb. 13: T-Zell Subpopulation im postoperativen Verlauf bei einem Patienten mit Epstein-Barr Virus (EBV) Infektion. Das am 33. postoperativen Tag entnommene Blut zeigte die ersten serologischen Anhaltspunkte einer solchen Infektion.

des Blutes zur Bestimmung der Virusserologie fielen entsprechend der Abb. 13 die T 4+ Zellen drastisch ab. Gleichzeitig stiegen die T 8+ Zellen deutlich an. Die Gesamt-T-Zellen blieben dementsprechend konstant. Damit waren die OKT 3 markierten Zellen nur geringen Schwankungen unterworfen. Das Verhältnis T 4/T 8 fiel am 40 p.Op Tag auf 0.07 ab und blieb während des gesamten Aufenthaltes des Patienten in der Klinik unter 1. Ab dem 29. postoperativen Tag wurde bei diesem Patienten die Basisimmunsuppression mit Azathioprin aufgrund ausgeprägter Leukopenie unterbrochen. Am 33. Tag wurde dann eine Abstoßungstherapie mit 250 mg Methylprednisolon pro Tag begonnen, die ab dem 37. Tag mit der Gabe von ALG ergänzt wurde. Nachdem das Ergebnis der Serologie vorlag, wurde diese Therapie am 42. Tag eingestellt. Daraufhin besserte sich der klinische Verlauf. Eine zufriedenstellende Organfunktion konnte nicht mehr hergestellt werden.

Bei dem zweiten Patienten wurden Bestimmungen der lymphozytären Subpopulationen nach Abnahme einer IgM positiven Blutprobe aus technischen Gründen nicht durchgeführt.

4.1.3.2 Zytomegalie Virus Infektionen

Bei 15 Patienten wurden Zytomegalie Virus (CMV) Infektionen beobachtet. Bei 9 dieser Patienten wurde im zeitlichen Zusammenhang mit den serologischen Titeranstiegen eine Umkehr des Verhältnisses von T 4+ zu T 8+ Zellen festgestellt. Wie die Tabellen 12 und 13 zeigen, konnte diese Umkehr bei einem Titeranstieg von CMV-IgM $\geq 1:160$ in 7 von 10 Fällen nachgewiesen werden. Die Komplementbindungsreaktion war vor diesem Zeitpunkt nur in

Titeranstieg des CMV-IgM $\geq 1:160$

Name	4/8 < 1	KBR vor IgM Titeranstieg	Behandlung des Virusinfektes	Zeitabstand der ersten 4/8 Umkehr zum IgM-Titeranstieg
B.H.	ja	neg.	nein	10 Tage davor (keine Werte dazwischen)
P.S.	ja	neg.	Wechsel von Cy-A auf Azathioprin	1 Tag davor
S.E.	ja	neg.	Absetzen der Immunsuppression	am selben Tag
S.J.	ja	1:8	nein	am selben Tag
G.H.	ja	nein	nein	2 Tage später
B.K.-K.	ja	nein	Vidarabin + Intraglobin	6 Tage später (keine Werte dazwischen)
S.F.	ja	nein	nein	11 Tage später (keine Werte dazwischen)
M.I.	nein	1:16	nein	5 Tage davor (keine Werte danach)
P.M.	nein	nein	nein	2 Tage davor (keine Werte danach)
H.P.	nein	nein	nein	3 Tage später (keine Werte danach)

Tabelle 12: Diese zehn Patienten zeigten einen deutlichen CMV-IgM Titeranstieg. Die Reaktion der T-Zell Subpopulationen verdeutlicht das Verhältnis von OKT 4 zu OKT 8. Alle Patienten standen unter Cyclosporin-A Basistherapie.

Titeranstieg des CMV-IgM $\geq$ 1:40

Name	4/8 < 1	KBR vor IgM Titeranstieg	Behandlung des Virusinfektes	Zeitabstand der ersten 4/8 Umkehr zum IgM-Titeranstieg
B.A.	ja	1:64	nein	14 Tage danach (keine Werte dazwischen)
I.B.	ja	unbekannt	nein	12 Tage danach (1 Wert 7 Tage danach: 4/8 = 1.3)
M.H.	nein	1:8	Vidarabin	jeweils letzter Wert: 4 Tage davor
W.R.	nein	neg.	Intraglobin	3 Tage danach
H.G.	nein	1:32	nein	8 Tage danach

Tabelle 13: Grenzwertig positiver CMV-IgM Titeranstieg von 1:40 bei fünf Patienten.
Im weiteren Verlauf stieg die Komplementbindungsreaktion innerhalb von 2 Monaten auf mindestens das Vierfache des Ausgangstiters zum Zeitpunkt des fraglichen IgM-Anstiegs an. Nur Patient H.G. stand unter Azathioprin-, alle anderen unter Cyclosporin-A Basistherapie.

einem Fall sicher und in einem weiteren Fall grenzwertig positiv. Bei einem Titeranstieg von CMV-IgM $\geq 1:40$ war nur in 2 von 5 Fällen das Verhältnis T 4/T 8 kleiner als eins. Die KBR war nur in einem Fall sicher negativ. Insgesamt hatten 23% aller Patienten vor Transplantation einen CMV-KBR Titer größer als 1:8. Die Verlaufsbeobachtung eines Patienten (Abb. 14) zeigt zum Zeitpunkt der nachgewiesenen IgM Antikörperreaktion bereits eine Verminderung der OKT 4 markierten Zellen. Der Anstieg der OKT 8 positiven Zellen folgte mit einer geringen Verzögerung. Das Verhältnis T 4/T 8 betrug am 35. postoperativen Tag 0.2 und erreichte am 70. postoperativen Tag mit 0.15 den niedrigsten Wert. Die Umkehr des Verhältnisses hielt über 60 Tage an.

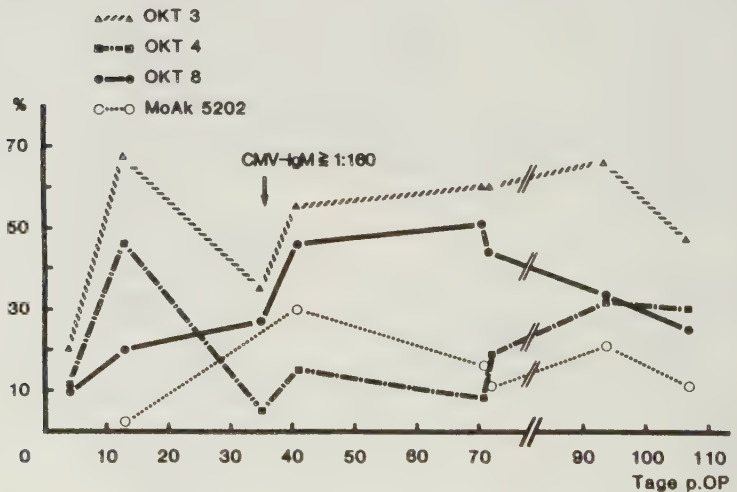


Abb. 14: Lymphozytäre Subpopulationen eines Patienten mit Zytomegalie Virus (CMV) Infektion. Postoperativer Verlauf.

Verlaufsbeobachtungen zur Beurteilung der Dauer dieser Umkehr bei CMV Infektionen liegen von fünf weiteren Patienten vor. Das Verhältnis T 4/T 8 blieb bei einem dieser Patienten ebenfalls über 2 Monate lang unter eins. Eine Herpes Simplex Virus Infektion schloß sich an, die zu einer zusätzlichen Verlängerung der Umkehr führte. Ein weiterer Patient erreichte bereits nach einem Monat wieder Werte über eins. Die drei restlichen Patienten zeigten schon nach einer Woche wieder normale Werte. Dazu gehören auch die beiden Patienten mit einem CMV IgM-Titer $\geq 1:40$.

Bei den anderen Fällen von CMV Infektionen mit T 4/T 8 Umkehr kann die Dauer der Umkehr aufgrund frühzeitiger Entlassung bzw. Explantation nicht beurteilt werden.

Im Gegensatz zu den beiden EBV Infektionen konnten bei den CMV Infekten auch Bestimmungen mit dem monoklonalen Antikörper 5202 durchgeführt werden. Hohe Anteile am mononukleären Konzentrat zeigten die Zellen dieses Phänotyps in einem Zeitraum von 14 Tagen vor bzw. 7 Tage nach CMV IgM-Titeranstieg. Bei 8 Patienten mit einem Titeranstieg von $\geq 1:160$ lagen die jeweils höchsten Werte bei $24.6\% \pm 9.1\%$. Der Durchschnitt aller unter Cyclosporin-A Basistherapie bestimmten Werte der mit diesem Antikörper markierten Zellen war $12.0\% \pm 5.2\%$. Die drei Fälle mit einem CMV IgM-Titeranstieg von $\geq 1:40$ boten mit $15\% \pm 3.3\%$ keine wesentliche Abweichung.

Unter Berücksichtigung der Ausgangswerte entspricht der Anstieg der MoAK 5202 positiven Zellen in 6 verwertbaren Fällen einer Steigerung von $5.8\% \pm 2.1\%$ auf $25\% \pm 5.7\%$. Es lagen 16.8 ± 12.4 Tage zwischen beiden Bestimmungen. Ähnlich wie in Abb. 14 folgte dem höchstem Wert ein allmählicher Abfall innerhalb der nächsten Wochen.

4.1.3.3 Herpes Simplex Virus Infektionen

Bei fünf Patienten mit serologischen Hinweisen auf eine Herpes Simplex Virus (HSV) Infektion wurden die Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bestimmt. Davon wurde in drei Fällen eine Umkehr von T 4/T 8 festgestellt. Diese Umkehr wurde 7 und 16 Tage nach bzw. 54 Tage vor Anstieg der KBR beobachtet. Im letzteren Fall war bei eindeutiger Klinik eine Bestimmung der KBR Titer zum Zeitpunkt der Umkehr mißglückt. Bei dem in Abbildung 15 dargestellten Verlauf erreichte das Verhältnis T 4/T 8 zu Beginn einen Wert von 0.25 und blieb über mehr als 50 Tage unter eins. Bei einem weiteren Patienten blieben die Werte 32 Tage lang unter eins. Bei einem dritten Patienten kam nach 6 Tagen eine Zytomegalie Virus Infektion hinzu, so daß zur Dauer der Umkehr unter HSV allein keine Aussage gemacht werden kann. In diesem Fall wurde die Therapie von Cyclosporin-A auf Azathioprin umgestellt. Die Patientin, deren Verlauf in Abbildung 15 dargestellt ist, wurde ab dem 49. postoperativen Tag mit Vidarabin und Intraglobulin behandelt. Der Anteil der MoAK 5202 markierten Zellen wurde in den drei Fällen bestimmt, die eine T 4/T 8 Umkehr aufwiesen. In dem auf Abbildung 15 gezeigten Verlauf wurde 23 Tage nach Anstieg des HSV KBR-Titers ein Wert von 21% MoAK 5202 positiver Zellen bestimmt. Vorhergehende Werte liegen leider nicht vor. Bei dem zweiten Patienten wurde einen Tag nach der T 4/T 8 Umkehr ein Anstieg von 6% auf 20% beobachtet. Die Beurteilung des dritten Falles ist nicht eindeutig möglich. Es zeigte sich zwar am Tag der Umkehr eine Steigerung von 6% auf 30%. Einen Tag danach war aber bereits ein CMV IgM-Titer von $\geq 1:160$ vorhanden. Der hohe Anteil der MoAK 5202 markierten Zellen kann also auch mit der CMV Infektion zusammenhängen.

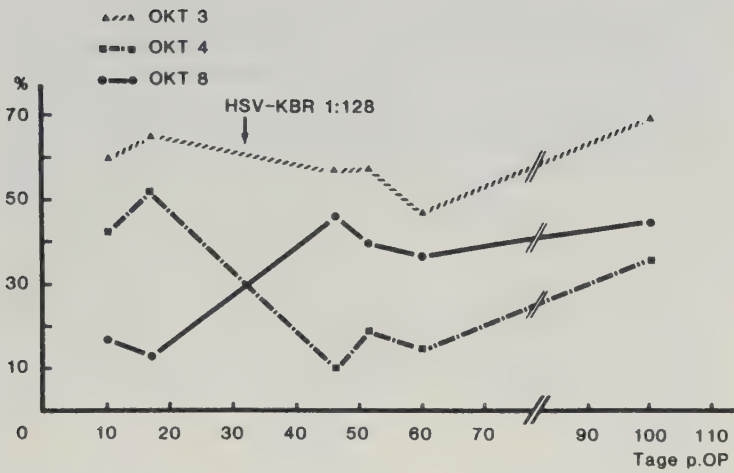


Abb. 15: Postoperativer Verlauf der T-Zell Subpopulationen bei einer Patientin mit Herpes Simplex Virus (HSV) Infektion

4.1.3.4 T- und B-Zell Parameter bei Virusinfektionen der Herpes Gruppe im Vergleich mit nicht unter Virusinfektion bestimmten Werten

Eine Gegenüberstellung der lymphozytären Subpopulationen der beiden Basistherapiegruppen der serologisch nicht virusverdächtigen Fällen zeigt nur in der Berechnung des Verhältnisses T 4/T 8 signifikante Unterschiede (Tab. 14).

Basistherapie:	negative Virusserologie	
	Azathioprin	Cyclosporin-A
Anzahl der Patienten	37	51
Verhältnis von OKT 4 zu OKT 8	2.09 ± 1.10 (n = 127)	$1.61 \pm 0.67^*$ (n = 152)
Summe aus OKT 4 + OKT 8 in %	47.1 ± 17.3 (n = 133)	47.6 ± 16.6 (n = 157)
OKT 3 in %	43.8 ± 15.6 (n = 133)	44.1 ± 15.3 (n = 157)
MoAk 5202 in %	12.8 ± 3.0 (n = 8)	12.4 ± 6.1 (n = 142)
Patienten	8	47

Tab. 14: Gegenüberstellung lymphozytärer Subpopulationen im mononukleären Konzentrat des peripheren Blutes bei unterschiedlicher Basistherapie. Keine signifikanten Veränderungen der serologischen Virustiter.
*Der Unterschied ist mit $p \leq 0.001$ signifikant (t-Test)

positive Virusserologie			
	CMV	HSV	EBV
Patienten insgesamt	15	5	2
Patienten mit OKT 4 zu OKT 8 < 1	9	3	1
Verhältnis von * OKT 4 zu OKT 8	0.51 ± 0.23 (n = 18)	0.58 ± 0.21 (n = 10)	0.43 ± 0.24 (n = 5)
Summe aus ** OKT 4 + OKT 8 in %	55.3 ± 12.7 (n = 18)	59.4 ± 11.7 (n = 10)	63.2 ± 2.9 (n = 5)
OKT 3 in % ***	54.4 ± 12.1 (n = 18)	53.9 ± 11.6 (n = 10)	55.4 ± 4.5 (n = 5)
MoAk 5202 **** in %	19.0 ± 11.2 (n = 15)	19.5 ± 9.0 (n = 8)	-
MoAk 5202 bei CMV IgM ≥ 1:160 in % (höchste Werte)	24.6 ± 9.1 (n = 8)		
Basistherapie	alle 9 Cy-A	alle 3 Cy-A	Azathioprin

Tab. 15: Lymphozytäre Subpopulationen des peripheren Blutes bei Patienten mit positiver Virusserologie und T 4/T 8 Umkehr. Vergleich mit den zugehörigen Basistherapiegruppen aus Tab. 15:

* $p \leq 0.0001$ (für alle drei Infektionen)

** $p \leq 0.05$ / *** $p \leq 0.05$ (jeweils schlechteste Schranke)

**** $p \leq 0.05$ (nur für CMV)

Ein Vergleich der lymphozytären Subpopulationen bei negativer Virusserologie mit denen bei positiver Serologie zeigt bei allen T-Zell Parametern signifikante Unterschiede (Tab. 15). Für die CMV Infektionen kann auch eine signifikante Erhöhung der MoAk 5202 positiven Zellen nachgewiesen werden. Dies gilt besonders für die Fälle, bei denen der CMV-IgM Titer größer gleich 1:160 war. Auch unter HSV Infektion ergeben sich erhöhte Durchschnittswerte für diese Subpopulation. Ein Vergleich der verschiedenen Virusinfektionen untereinander bezüglich der lymphozytären Subpopulationen zeigt keine wesentlichen Veränderungen in einer der drei Gruppen.

Eine Umkehr des Verhältnisses von T 4/T 8 wurde nicht nur bei positiver Virusserologie, sondern auch bei negativer Serologie beobachtet. Unter Cyclosporin-A Therapie wurden insgesamt bei 51 Patienten 157 Bestimmungen bei negativer Virusserologie durchgeführt. Dabei errechnete sich bei 9 Patienten 13 mal ein Verhältnis von T 4/T 8 kleiner als eins. Bei positiver Virusserologie wurde in der Cyclosporin-A Gruppe bei 14 Patienten in insgesamt 27 Bestimmungen eine Umkehr des Verhältnisses festgestellt. Trotz eindeutig positiver Serologie wurde aber bei weiteren 7 Patienten keine Umkehr des Verhältnisses beobachtet.

Ein Vergleich dieser vier Gruppen zeigt eine deutliche Erhöhung der Werte für OKT 3 in den beiden Gruppen mit positiver Virusserologie gegenüber den beiden Gruppen mit negativer Virusserologie (Abb. 17). Die Umkehr des Verhältnisses von T 4/T 8 beruht sowohl auf einem Abfall des Anteil der T 4+ Zellen, als auch auf einem Anstieg der T 8+ Zellen. Dabei ist der Abfall der T 4+ Zellen bei negativer Serologie von $28.6\% \pm 11.3\%$ auf $21.3\% \pm 6.3\%$

fast genauso ausgeprägt wie bei positiver Serologie mit einem Wert von $19.1\% \pm 7.2\%$. Der Anstieg der T 8+ Zellen von $18.7\% \pm 7.3\%$ auf $26.1\% \pm 8.0\%$ bei negativer Virusserologie bleibt dagegen deutlich unter dem Durchschnittswert von $37.6\% \pm 9.3\%$ bei positiver Virusserologie. Eine signifikante Erhöhung der Werte des monoklonalen Antikörpers 5202 zeigte sich nur in dieser Gruppe. In der

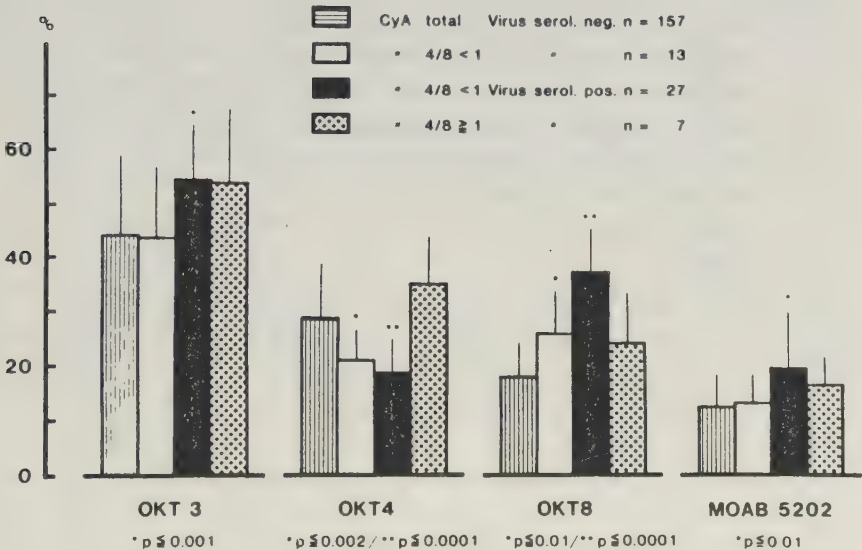


Abb. 17: Gegenüberstellung lymphozytärer Subpopulationen bei negativer und positiver Virusserologie. Weiterhin wird in Gruppen mit und ohne Umkehr des Verhältnisses T 4/T 8 unterteilt. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich mit der ersten Gruppe (alles t-Tests).

letzten Gruppe mit positiver Virusserologie ohne Umkehr von T 4/T 8 waren alle Subpopulationen gegenüber der Zusammenfassung der Werte unter negativer Serologie leicht erhöht.

Insgesamt wurden bei 7 Patienten im Zeitraum einer positiven Virusserologie mehr als zweimal die Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bestimmt. In all diesen Fällen erreichte das Verhältnis von T 4/T 8 einen Wert von 0.5 oder darunter. Bei negativer Serologie wurden als niedrigste Werte dreimal 0.6 bestimmt.

Unter Azathioprintherapie wurde in 7 Fällen bei negativer Serologie eine Umkehr des Verhältnisses festgestellt. Alle diese Werte waren nach ALG Therapie bestimmt worden. Eine Analyse dieser Konstellation unter Cyclosporin-A Therapie zeigte, daß nur 5 Werte nach ALG Gabe, 3 davor und weitere 5 ohne Zusammenhang mit ALG Gabe bestimmt worden waren.

4.2 Untersuchungen im Feinnadelaspirat (FNA)

Bei etwa 300 Feinnadelbiopsien wurde versucht, die lymphozytären Subpopulationen des Aspirats mit monoklonalen Antikörpern zu markieren. Verwertbare Ergebnisse gab es in 160 Fällen. Davon konnten in 104 Aspiraten alle drei T-Zell Subpopulationen bestimmt werden (Tab. 16). Durch gleichzeitige zytologische Beurteilung wurden diese Asparate verschiedenen Abstufungen des "corrected Increment" zugeteilt.

C.I.	0 - 1.0	1.0 - 2.5	2.5
n	39	28	37
FNA	8.3 ± 4.4	14.7 ± 6.7	29.8 ± 12.1
Ly im			
p.B.	7.1 ± 4.2	7.6 ± 4.6	9.9 ± 10.2
im			
OKT 3	8.0 ± 3.6	13.5 ± 5.6	23.0 ± 9.9
OKT 4	4.0 ± 2.6	5.0 ± 2.6	6.8 ± 3.7
FNA			
OKT 8	4.4 ± 2.5	10.0 ± 5.3	18.3 ± 9.9
FNA	1.54 ± 1.31	2.30 ± 1.18	3.84 ± 3.70
<u>OKT 8</u>			
OKT 4			
p.B.	0.68 ± 0.38	0.78 ± 0.55	1.06 ± 0.88

Tab. 16: Prozentualer Anteil der Lymphozyten und deren T-Zell Subpopulationen, sowie die Werte der Berechnung des Verhältnisses von T 8/T 4 in verschiedenen Abstufungen des "corrected increment" (C.I.).

4.2.1 Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei negativer Virusserologie

4.2.1.1 Azathioprin Basistherapie

Bei Azathioprin Basistherapie ohne zusätzliche Abstoßungstherapie zeigt sich ein signifikanter Anstieg der T 3+ und T 8+ Zellen im Aspirat von $7.6\% \pm 2.8\%$ bzw. $4.3\% \pm 1.9\%$ in der ersten Stufe des "corrected increment" auf $18.3\% \pm 4.3\%$ bzw. $13.3\% \pm 4.3\%$ in der zweiten Stufe. Der weitere Anstieg dieser beiden Subpopulationen mit Zunahme

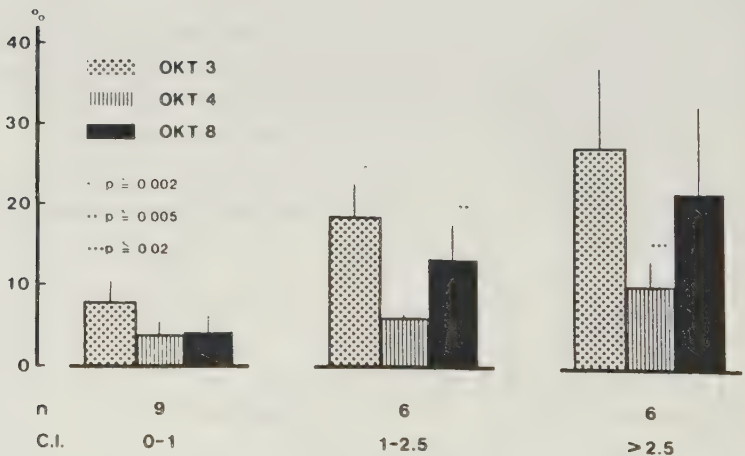


Abb. 18: T-Zell Subpopulationen im FNA bei Azathioprin Basistherapie ohne zusätzliche Abstoßungstherapie bei ansteigender Inflammation im Transplantat. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich mit der ersten Stufe des "corrected increment" (C.I.) (OKT 3 und OKT 8 t-Tests, OKT 4 Wilcoxon Test).

der Inflammation ist nicht signifikant. Der leichte Anstieg der T 4+ Zellen wird dagegen erst im Vergleich von der ersten Stufe zur dritten Stufe signifikant (Abb 18).

Bei zusätzlicher Therapie nach durchschnittlich 5.0 ± 2.9 ALG Tagen und hohen Dosen Methylprednisolon erfolgt nur ein geringer Anstieg der T-Zell Subpopulationen in den verschiedenen Graden der Abstoßungsreaktion (Abb. 19).

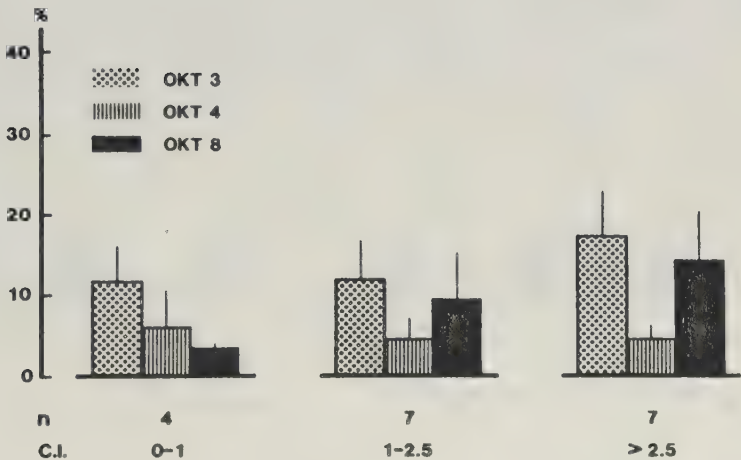


Abb. 19: T-Zell Subpopulationen unter Azathioprin Basistherapie und zusätzlicher Gabe von 5.0 ± 2.9 Dosen ALG und hohen Dosen Methylprednisolon im FNA bei Anstieg der Inflammation im Transplantat.

Der Anteil der OKT 4 markierten Zellen bleibt auch bei starker Inflammation des Transplantats bei $4.6\% \pm 1.7\%$. Diesem Wert entspricht ein Durchschnitt von $9.8\% \pm 3.4\%$ ($p \leq 0.02$ Wilcoxon Test)

bei reiner Azathioprin Basistherapie. Die beiden anderen Subpopulationen unterscheiden sich nicht signifikant von denen unter reiner Basistherapie. Diese Befunde spiegeln sich auch in der Berechnung des Verhältnisses von T 8/T 4 wieder. Die Gegenüberstellung der beiden Therapiegruppen (Abb. 20)

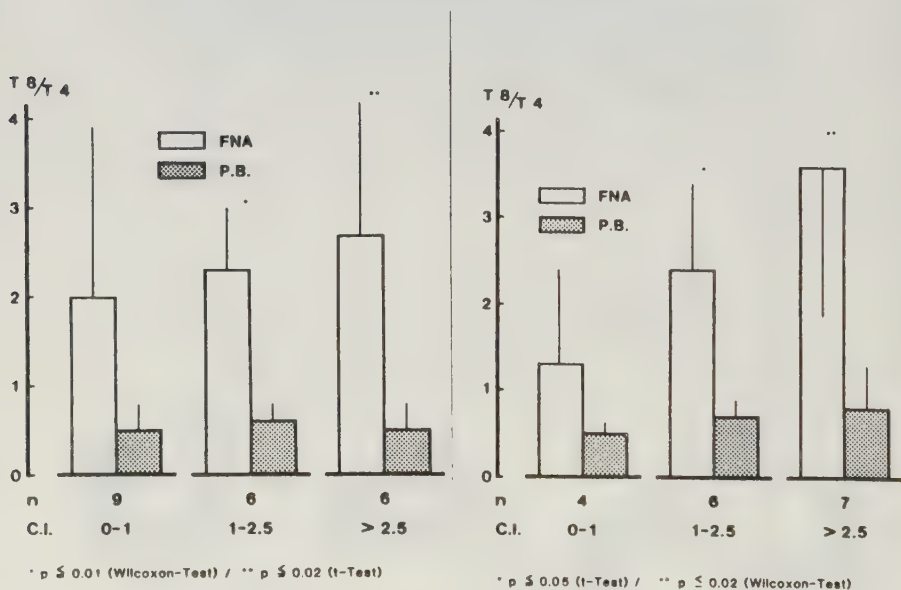


Abb. 20: Verhältnis von T 8/T 4 im FNA und im peripheren Blut in Abhängigkeit vom "corrected increment" (C.I.).

Linke Graphik: Ergebnisse bei reiner Azathioprin Basistherapie.

Rechte Graphik: Werte bei zusätzlicher Abstoßungstherapie mit ALG und Methylprednisolon.

Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich der Werte im FNA mit denen im p.B.

zeigt mit zunehmender Inflammation einen nur flachen Anstieg der Werte in der Basistherapiegruppe. Unter zusätzlicher Abstoßungstherapie ergibt sich ein deutlich steilerer Anstieg dieses Verhältnisses im Transplantat. Die Zusammensetzung der T-Zell Subpopulationen unterscheidet sich ab einem "corrected increment" von über eins durch Überwiegen der T 8+ Zellen signifikant von den Verhältnissen im peripheren Blut.

4.2.1.2 Cyclosporin-A Basistherapie

Unter Cyclosporin-A Therapie werden die Ergebnisse durch die Werte des monoklonalen Antikörpers 5202 ergänzt. Es wurden wiederum nur die Fälle bearbeitet, bei denen alle drei T-Zell Subpopulationen sowohl im Feinnadelaspirat, als auch im peripheren Blut bestimmt werden konnten.

Eine signifikante Zunahme der T 3+ und T 8+ Zellen zeigt sich erst in der dritten Stufe des "corrected increment" mit $21.2\% \pm 9.2\%$ bzw. $14.5\% \pm 5.9\%$ gegenüber $7.9\% \pm 2.3\%$ bzw. $3.7\% \pm 1.4\%$ in der ersten Stufe. Der leichte Anstieg der OKT 4 und auch der MoAk 5202 markierten Zellen ist nicht signifikant (Abb. 21).

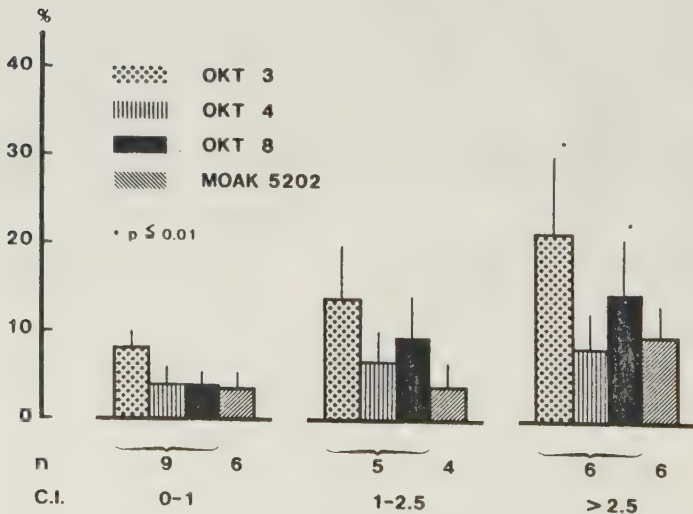


Abb. 21: Lymphozytäre Subpopulationen im FNA bei Cyclosporin-A Basistherapie ohne zusätzliche Abstoßungstherapie bei ansteigender Inflammation im Transplantat. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich mit der ersten Stufe des C.I. (OKT 8 t-Test, OKT 3 Wilcoxon Test).

Unter zusätzlicher Abstoßungstherapie mit 3 mal 500 mg Methylprednisolon konnten nur Aspirate der ersten und der dritten Stufe des "correted increment" ausgewertet werden. Es handelt sich also im ersten Fall um eine erfolgreiche und im zweiten Fall um eine unzureichende Therapie. Wiederum ist nur der Anstieg der T 3+ und T 8+ Zellen von $6.1\% \pm 2.2\%$ bzw. $4.3\% \pm 1.9\%$ auf $20.1\% \pm 5.8\%$ bzw. $13.0\% \pm 3.6\%$ signifikant (Abb. 22).

Die einzelnen Subpopulationen im Aspirat nach hohen Dosen Methylprednisolon zeigen nur geringe Unterschiede zu den entsprechenden Werten unter reiner Cyclosporin-A Basistherapie.

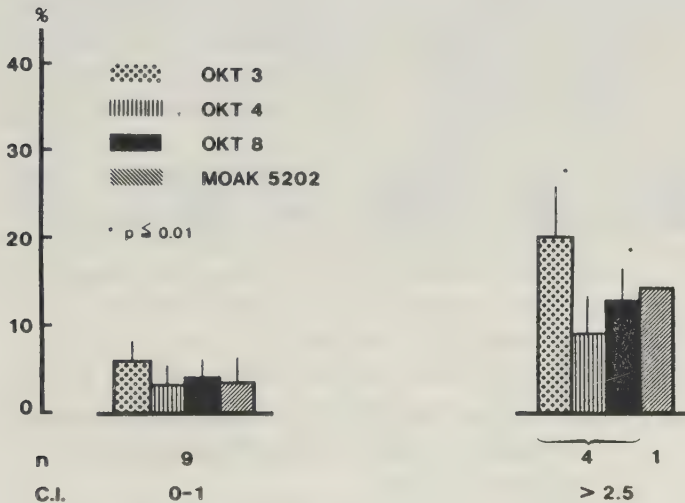


Abb. 22: Lymphozytäre Subpopulationen im FNA bei verschiedenen Inflamationsgraden im Transplantat unter Cyclosporin-A Therapie, 1.5 ± 0.7 Tage nach 3 mal 500 mg Methylprednisolon. (Wilcoxon Tests).

Auch die Berechnung des Verhältnisses von T 8/T 4 im Aspirat und im peripheren Blut brachte keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen (Abb. 23).

Der Vergleich der Azathioprin Basistherapiegruppe mit der Cyclosporin-A Gruppe jeweils ohne Zusatztherapie zeigt bei zunehmender Inflammation in der

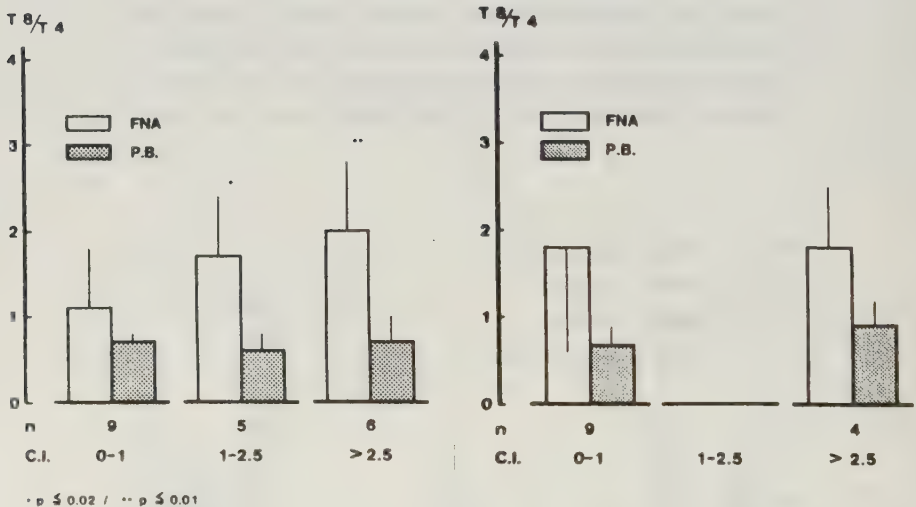


Abb. 23: Verhältnis von T 8/T 4 im FNA und im p.B. bei ansteigender Inflammation nach Nierentransplantation.

Linke Graphik: Ergebnisse bei reiner Cyclosporin-A Therapie.

Rechte Graphik: Werte 1.5 ± 0.7 Tage nach Gabe von 3 mal 500 mg Methylprednisolon. Die Signifikanzschranken beziehen sich auf den Vergleich der Werte im FNA mit denen im p.B. (Wilcoxon Tests)

Azathiopringruppe eine deutlichere Zunahme der OKT 3 und der OKT 8 markierten Zellen. Die Werte für OKT 4 sind in beiden Gruppen nahezu gleich. Daraus errechnet sich unter Azathioprin ein höheres Verhältnis von T 8/T 4 im Aspirat als unter Cyclosporin-A Therapie. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

4.2.1.3 Überwiegen der T 4+ Zellen im Feinnadelaspirat

Unter den 170 Feinnadelaspiraten, deren lymphozytäre Subpopulationen bestimmt wurden, waren 31 bei denen der Anteil der T 4+ Zellen größer war als der von T 8+ Phänotypen. Davon waren 17 in der Gruppe mit einem "corrected increment" von 0 - 1, 6 in der Gruppe von 1 - 2.5 und 8 in der Gruppe über 2.5.

Diese 8 FNABs wurden in 6 Fällen entweder unter klinisch unauffälligen Bedingungen oder nach erfolgreicher Therapie entnommen. Trotz des hohen Inflamationsgrades war nur zweimal eine Abstoßungstherapie erforderlich. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, ergibt sich bei einem Überwiegen der OKT 8 markierten Zellen bei hohem Inflamationsgrad eine deutlich schlechtere klinische Situation als bei einem Überwiegen der T 4+ Zellen.

Neben der aktuellen klinischen Situation wurde auch der Langzeitverlauf der Patienten untersucht. Solche Patienten, die im FNA bei hoher Inflammation immer ein Verhältnis von T 8/T 4 > 1 zeigten, mußten in einem Beobachtungszeitraum von einem 1/2 bis zu 1 1/2 Jahren mit 11 ± 8 Dosen ALG behandelt werden. Bei den acht Patienten mit einem umgekehrten Verhältnis waren es 13 ± 6 ALG Tage.

C.I. > 2,5

		8/4 < 1		8/4 > 1	
T H E R A P I E	Ø	4	6	2	7
	NACH	2		5	
	ZWISCHEN ALG-ZYKLEN	0	2	3	28
	VOR	2		25	
EXPLANTATION		0		4	

Abb. 24: Gegenüberstellung von FNAs mit einem Verhältnis von T 8/T 4 < 1 zu FNAs mit umgekehrtem Verhältnis in Abhängigkeit von der aktuellen klinischen Situation. Es sind nur FNAs mit hohen Inflamationsgraden und bei negativer Virusserologie miteinbezogen.

Von den Feinnadelaspiraten mit T 8/T 4 > 1 wurden 26 unter Azathioprin Basistherapie und 13 unter Cyclosporin-A Therapie entnommen. In der anderen Gruppe waren 6 FNABs unter Azathioprin und 2 unter Cyclosporin-A Behandlung ausgeführt worden.

Als weiteres Kriterium wurde die Abhängigkeit des Verhältnisses von T 8/T 4 im Aspirat von dem HLA-A, -B, -C, und HLA-DR "mismatch" zwischen Spender und Empfänger analysiert. (Abb. 25). Zwar kann eine gewisse Häufung der Fälle mit T 8/T 4 > 1 bei drei-

fachem HLA-A, -B, -C "mismatch" und einfachem HLA-DR "mismatch" festgestellt werden. Sie entspricht aber nur der allgemeinen Häufigkeitsverteilung.

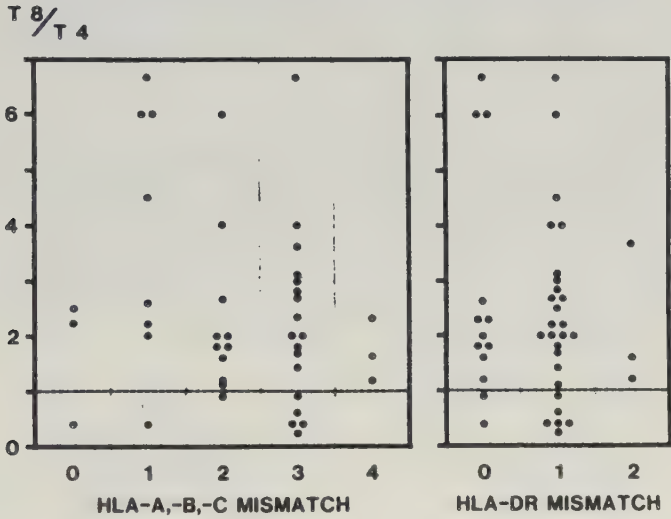


Abb. 25: Verhältnis $T8/T4$ im FNA in Abhängigkeit vom HLA "mismatch" zwischen Spender und Empfänger.

4.2.2 Lymphozyten-Subpopulationen im FNA bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe

Die Veränderungen in der Zusammensetzung der lymphozytären Subpopulationen, die bei Virusinfektionen der Herpes Virusgruppe im peripheren Blut be-

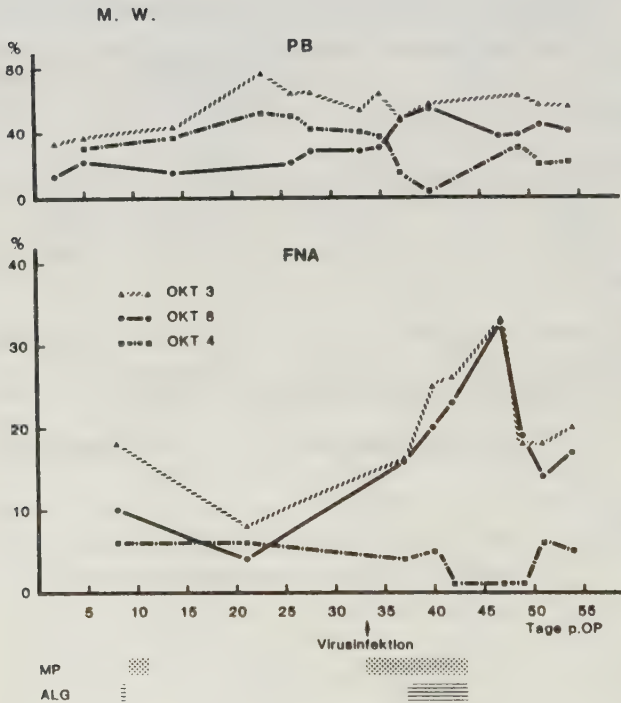


Abb. 26: T-Zell Subpopulationen im postoperativen Verlauf bei einem Patienten mit Epstein-Barr Virus Infektion. Im oberen Abschnitt sind die Werte im peripheren Blut, im unteren die Werte im Feinnadelaspirat dargestellt.

schrieben wurden, können z.T. auch in der Zusammensetzung der Subpopulationen im FNA wiedergefunden werden. Sehr deutlich zeigte sich dies bei einem Patienten mit EBV Infektion (Abb. 26). Mit der Umkehr des Verhältnisses T 4/T 8 im p.B. ging ein drastischer Anstieg der T 8+ Zellen im Transplantat einher. Etwas später folgte ein Abfall der T 4+ Zellen.

Bei 6 der 13 Patienten mit einer Umkehr von T 4/T 8 im peripheren Blut wurde in 10 Feinnadelbiopsien eine Inflammation mit einem "corrected increment" von über 2.5 registriert. Bei diesen ausgeprägten Inflammationsgraden war der Anteil der T 3+ Zellen $35.4\% \pm 12.2\%$ und der der T 8+ Zellen $30.9\% \pm 9.0\%$ (Abb.27). Ein Anstieg der mit dem MoAk 5202 mar-

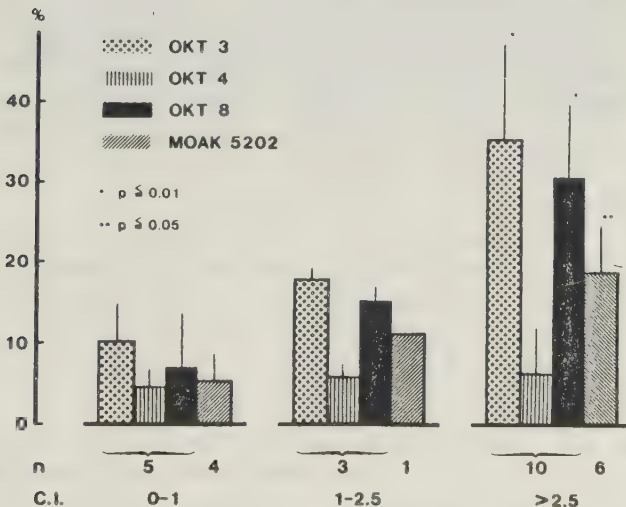


Abb. 27: Lymphozytäre Subpopulationen im FNA bei positiver Virusserologie in Abhängigkeit von der Zunahme der Inflammation der Transplantats (Wilcoxon Tests)

kierten Zellen auf $18.7\% \pm 6.1\%$ konnte beobachtet werden, während der Anteil der OKT 4 markierten Zellen auch mit zunehmender Inflammation bei etwa 5% blieb.

Eine Zusammenfassung der Befunde bei einem "corrected increment" von mehr als 2.5 in den Fällen mit negativer und in den Fällen mit positiver Virusserologie zeigt in 3 Parametern des

		AR (C.I. > 2.5)		VIRUS		P ≤
		%	n	%	n	
LY	in FNA	27.5 ± 10.5	51	45.6 ± 15.9	12	0.005 (t)
	in p.B.	6.1 ± 5.1	"	19.8 ± 13.2	"	0.005 (t)
FNA	OKT 3	21.5 ± 10.3	48	36.3 ± 11.8	12	0.002 (W)
	OKT 4	8.1 ± 4.7	45	5.9 ± 5.5	"	
	OKT 8	15.8 ± 8.8	50	32.3 ± 9.2	"	0.0001 (t)
	MoAk 5202	11.3 ± 6.3	12	18.7 ± 6.1	6	
P.B.	OKT 3	49.8 ± 15.1	35	57.3 ± 5.0	10	
	OKT 4	32.5 ± 11.5	"	16.7 ± 6.3	"	0.002 (W)
	OKT 8	20.1 ± 8.0	"	43.0 ± 7.5	"	0.002 (W)
	MoAk 5205	12.2 ± 7.0	10	22.5 ± 8.6	6	

Tab. 17: Gegenüberstellung der Parameter des Monitorings bei Abstoßungsreaktionen (AR) und bei Inflammation des Transplantats während Virusinfektionen.

LY = Anteil der Lymphozyten in der zytologischen Auswertung. t = t-Test, W = Wilcoxon Test

Feinnadelaspirats und in 3 Parametern des peripheren Blutes signifikante Unterschiede der beiden Gruppen zueinander (Tab. 17).

Der klinische Verlauf der 6 Patienten mit einer starken Inflammation des Transplantats bei Virusinfektion ist nicht einheitlich. Vor Erhalt der serologischen Befunde wurden 4 dieser Patienten mit ALG und Methylprednisolon, also im Sinne einer Abstoßungsbehandlung, therapiert. Nach mehreren Behandlungszyklen wurden 2 dieser Patienten wieder dialysepflichtig. Bei einem weiteren Patienten entwickelte sich nach einem protrahierten Verlauf mit ebenfalls mehreren Behandlungszyklen schließlich doch noch eine zufriedenstellende Organfunktion. Die Funktion des Transplantats verbesserte sich beim 4. Patienten spontan, nachdem die ALG Therapie nach wenigen Tagen abgebrochen worden war. In den zwei bisher nicht besprochenen Fällen wurde einmal antiviral mit Vidarabin und einmal gar nicht behandelt. Beide Patienten erfreuen sich heute einer guten Transplantatfunktion.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Untersuchungen des peripheren Blutes

5.1.1 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats von Normalpersonen

Die Werte lymphozytärer Subpopulationen sind bei Normalpersonen im Verlauf von Monaten konstant. Die nachgewiesenen Schwankungen im circadianen Rhythmus (12, 140) wurden durch die regelmäßige Blutentnahme am frühen Vormittag eliminiert. Unter der massiven Immunsuppression der transplantierten Patienten dürften diese vermutlich durch endogene Kortikosteroide bedingten Veränderungen sowieso nur noch eine untergeordnete Rolle spielen.

Die erhobenen Ergebnisse sprechen gegen eine jahreszeitliche Abhängigkeit der untersuchten Subpopulationen. Auch banale Infekte der oberen Atemwege, wie sie bei den Versuchspersonen immer wieder auftraten, scheinen die Werte nicht zu beeinflussen. Da nur wenige Bestimmungen bei einer weiblichen Person durchgeführt wurden, kann über einen eventuellen Zusammenhang mit dem menstruellen Zyklus (12) keine Aussage gemacht werden. Die interindividuellen Unterschiede waren zwar gering, aber aufgrund der erstaunlich schmalen Variationsbreite des einzelnen Individuums z.T. dennoch signifikant.

Im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls mit einem Fluoreszenzmikroskop arbeiteten (106), eine komplementabhängige Zytolysetechnik benutzten (166) oder sich eines "fluorescence activated cell sorters" (FACS) bedienten (42),

zeigen die Werte der monoklonalen Antikörper OKT 4 und OKT 8 gute Übereinstimmung. Die jeweiligen Mittelwerte liegen bei Abweichungen von $\pm 2-3\%$ in einem sehr engen Bereich. Der Mittelwert der OKT 3 markierten Zellen liegt etwa 9% unter den Mittelwerten anderer Untersuchungen (42, 166). Bei der Durchsicht der Literatur fällt auf, daß besonders jene Gruppen, die mit einem FACS arbeiten, höhere Werte für diesen Pan-T-Zell Marker erhalten.

Für den monoklonalen Antikörper Oy Medix 5202 gibt es bis jetzt keine brauchbaren Referenzwerte für Normalpersonen. Der Antikörper OKM 1 markierte den überwiegenden Anteil der T 3- T 4- T 8- MoAk 5202-Zellen, so daß die Summe aus OKT 4, OKT 8, MoAk 5202 und OKM 1 markierten Zellen mit durchschnittlich 97.4% fast das gesamte mononukleäre Konzentrat beinhaltet. Abweichungen davon würden sich durch eine mit diesen Antikörpern nicht erfaßte Subpopulation oder aus einer überlappenden Markierung der Antikörper erklären lassen.

Die Ergebnisse der Normalwertbestimmung bestätigen, daß die Methode der Markierung der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats zuverlässig angewandt wurde. Die Bestimmung der Normalwerte kann so dem Labor als Qualitätskontrolle dienen.

5.1.2 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats unter Immunsuppression bei negativer Virusserologie

5.1.2.1 Basistherapiegruppen (Kontrollgruppen)

Die Basistherapiegruppen sollen den Einfluß der Behandlung mit Azathioprin bzw. Cyclosporin-A zusammen mit der "low dose" Steroidtherapie auf

die lymphozytären Subpopulationen darstellen. Um dies zu erreichen, mußten möglichst viele Faktoren, die außerdem noch die Zusammensetzung des mononukleären Konzentrats verändern könnten, ausgeschlossen werden. Dazu zählen besonders die Infektionen der Herpes Virusgruppe, die in einem speziellen Abschnitt besprochen werden.

Zu diesen Faktoren wurden auch Abstoßungskrisen und ihre Therapie gerechnet, deren Einfluß auf die Subpopulationen ebenfalls eigens untersucht wurde. Da sich akute Abstoßungskrisen experimentell etwa innerhalb von 7 Tagen entwickeln (72), wurden nur solche Werte in die Basistherapiegruppen aufgenommen, die in mindestens diesem Abstand vor Anzeichen einer Abstoßungsreaktion bestimmt worden waren. Weiterhin wurde angenommen, daß 7 Tage nach zusätzlicher Therapie mit ALG oder Methylprednisolon die Zusammensetzung des mononukleären Konzentrats dadurch nicht mehr beeinträchtigt sei (41).

Zusätzlich wurden alle Werte unter Behandlung mit Cimetidin ausgeschlossen, da eine Beeinflussung der lymphozytären Subpopulationen durch dieses Medikament beschrieben wurde (38).

Die so gebildeten Wertegruppen dienten im folgenden als Kontrollgruppen; d.h. die Auswirkungen z.B. einer zusätzlichen Abstoßungstherapie oder von Abstoßungskrisen auf die Zusammensetzung des mononukleären Konzentrats wurden im Vergleich zu diesen Basistherapiegruppen analysiert. Die oben genannten Ausschlußkriterien für diese Kontrollgruppen können natürlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben. So wurde u.a. auch auf eine Beeinflussung der Subpopulationen durch Dialyse (37), durch Bluttransfusionen (55) und durch verschiedene operative Eingriffe (65, 66) hingewiesen.

Die Zahl der möglichen z.T. noch unbekannten Einflüsse ist so groß, daß man sich auf den Ausschluß der Faktoren beschränken muß, die im weiteren untersucht werden sollen oder relativ leicht zu eliminieren sind (91).

Unter Azathioprin- und "low dose" Steroidtherapie zeigt sich gegenüber den Normalwerten ein leicht verminderter Durchschnittswert der T 3+ Zellen und eine deutliche Verminderung der T 8+ Zellen. Die T 4+ Zellen blieben im Durchschnitt nahezu unverändert.

In experimentellen Studien konnte man in vitro eine Beeinflussung der T- und B-Zellfunktionen durch Azathioprin nachweisen (1, 10, 83, 103). Eine selektive Unterdrückung der Helferzellen wurde aus Beobachtungen im Mäusemodell vermutet (9). Studien an menschlichen Zellen hingegen sprachen eher für eine Verminderung der Suppressor/zytotoxischen Zellen (49). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen weitgehend mit letzteren Befunden überein.

In einer weiteren Studie, bei der das Monitoring im peripheren Blut mit denselben Antikörpern durchgeführt wurde, wird auch die große Streubreite der einzelnen Werte beschrieben (36). Dies gilt besonders für das Verhältnis T 4/T 8, das entsprechend den Veränderungen dieser beiden Subpopulationen einen Anstieg des Durchschnittswertes gegenüber den Normalwerten zeigt.

Die Auswertungen der Cyclosporin-A-Gruppe ergaben eine Verminderung der Durchschnittswerte aller T-Zell Subpopulationen. Die gleichmäßige Verminderung führt dazu, daß sich das Verhältnis T 4/T 8 im peripheren Blut im Durchschnitt nicht verändert. Die OKM 1 positiven Zellen steigen als Ausgleich

reziprok an, während die Werte des MoAk 5202 keine Abweichung von den Normalwerten zeigen.

Für Cyclosporin-A konnten sehr spezifische Wirkungen im Regulationsmechanismus der T-Zell Interaktionen nachgewiesen werden. So verhindert es unter bestimmten Versuchsbedingungen die Produktion von Interleukin 2 und somit die Proliferation sensibilisierter T-Zellen (172). Die bisherigen Erkenntnisse reichen aber nicht aus, um verschiedene, anscheinend widersprüchliche Versuchsergebnisse zu erklären (26, 52). Entsprechendes gilt erst recht für die Beobachtungen, die beim Monitoring der mononukleären Subpopulationen gemacht wurden.

Beim Vergleich einzelner Untersuchungen auf diesem Gebiet sollte man auch bedenken, daß manche Gruppen - wie in Großhadern - Cyclosporin-A mit "low dose" Steroiden kombinieren, während andere - vorwiegend in Großbritannien - Cyclosporin-A allein verabreichen.

Der von anderen Gruppen (157, 162) beobachtete Abfall des Verhältnisses T 4/T 8 kann hier nicht nachvollzogen werden. Allerdings blieben in den genannten Studien die Virusinfektionen unberücksichtigt, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese Verminderung durch Virusinfektionen mitverursacht wurde.

Interessant ist die Beobachtung (99), daß dieses Verhältnis unabhängig vom Cyclosporin-A Serumspiegel ist. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung war die Bestimmung des Serumspiegels noch unzuverlässig. Außerdem ist über die Pharmakokinetik des Medikamentes (75, 87) und über den Zusammenhang zwischen Serumspiegel und immunsuppressiver Wirkung (174) noch wenig bekannt. Deshalb wurde im Rahmen der Auswertungen auf einen Vergleich mit den Serumspiegeln verzichtet.

Für OKT 3 und Cyclosporin-A wird ein gemeinsamer Rezeptor an der Zelloberfläche der T-Zellen vermutet (119). Die beiden Substanzen hemmen sich kompetitiv in ihrer Wirkung. Trotzdem ist der Anteil der OKT 3 markierten Zellen nur wenig geringer als die Summe aus T 4+ und T 8+ Zellen. Möglicherweise ist nur die Anzahl der pro Zelle bindenden Antikörper vermindert.

5.1.2.2 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats vor Abstoßungskrisen

In vielen Studien wurde versucht, Veränderungen in der Zusammensetzung der Subpopulationen mononukleärer Zellen bei Abstoßungskrisen nachzuweisen. Cosimi et al. (42, 44) stellten fest, daß Patienten mit einem Verhältnis von T 4/T 8 von kontinuierlich über 1.3 ein erhöhtes Risiko einer Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten Monate nach Transplantation hatten. Diese Beobachtung konnte unter Modifizierung des Grenzwertes von einigen anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (13, 37, 144). Dabei wurde jeweils die Häufigkeit von Abstoßungskrisen in einem Zeitraum von mehreren Monaten nach Transplantation mit dem durchschnittlichen Verhältnis T 4/T 8 korreliert. Die Brauchbarkeit dieses Parameters zur Vorhersage individueller Abstoßungskrisen konnte jedoch nicht bewiesen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Zeitraum von 14 Tagen vor Abstoßungsreaktionen retrospektiv ausgewertet. Bei 8 Patienten konnten verwertbare Verläufe zusammengestellt werden. In 5 Fällen zeigte sich ein Anstieg der OKT 4 markierten Zellen eine Woche vor Beginn der Abstoßungs-

krise. Der statistische Vergleich der entsprechenden Mittelwerte ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Veränderungen der T 8+ Zellen waren nicht einheitlich. Auch der geringe Anstieg des Verhältnisses von T 4/T 8 in den Tagen vor der Abstoßungsreaktion war nicht signifikant. Insgesamt wurden 15 Bestimmungen in der Azathiopringruppe und 11 in der Cyclosporin-A Gruppe in der Woche vor Abstoßungsbeginn durchgeführt. Im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen

konnte bei keinem der bestimmten Parameter eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen der Untersuchung von Carter et al. (33) und anderen Studien, die ebenfalls keine signifikanten Schwankungen der Durchschnittswerte der Subpopulationen im selben Zeitraum zeigen konnten (113). Im Gegensatz dazu verweist eine Untersuchung von Stelzer et al. (149) auf eine hohe Spezifität und Sensitivität dieses Tests bei der aktuellen Vorhersage von Abstoßungsreaktionen. Voraussetzung sei ein Anstieg des Verhältnisses um mehr als das 1.5 fache, wiederum 7 Tage vor der Krise. Weitere Arbeiten demonstrierten die Abhängigkeit der Reversibilität der Abstoßungsreaktion von der Höhe des durchschnittlichen Verhältnisses (39, 163). Es ist im Rahmen der vorgelegten retrospektiven Untersuchung unmöglich, diese letzte Aussage nachzuvollziehen oder zu überprüfen.

Einige dieser Diskrepanzen in den Ergebnissen der verschiedenen Studien lassen sich aus Besonderheiten wie z.B. zusätzlichen Splenektomien (149) zumindest teilweise erklären. Eine gewisse Rolle mögen auch die verschiedenen Therapiekonzepte spielen. Die hier verwendete Definition der Abstoßungskrisen entspricht der, die auch von der überwiegenden Mehrzahl der anderen Arbeiten verwendet wurde.

In der Entwicklung monoklonaler Antikörper wird laufend daran gearbeitet, Antigene spezifischer Zellaktivierung zu finden. Es bleibt die Hoffnung, daß Zellmarker gefunden werden, die unabhängig von unspezifischen Einflüssen Abstoßungskrisen übereinstimmend vorraussagen oder zumindest eindeutig identifizieren können.

5.1.2.3 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats unter zusätzlicher Abstoßungstherapie

Die Analyse von Veränderungen der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei zusätzlicher Immunsuppression verfolgt mehrere Ziele. Man erwartet aber in erster Linie Hinweise auf spezielle Wirkungsmechanismen der verwendeten Medikamente. Daraus könnte dann eine Beurteilung der allgemeinen und individuellen Wirksamkeit an Hand der bestimmten Parameter entwickelt werden. So könnte wiederum ein optimales Therapiekonzept dem einzelnen Patienten oder einer bestimmten Situation angepaßt werden.

In der Azathiopringruppe wurde häufig mit ALG plus Methylprednisolon bei Abstoßungskrisen behandelt. Es konnten 5 Verläufe von Patienten, die zwischen 7 und 12 Tagen mit ALG behandelt wurden, zusammengestellt werden. Dabei zeigte sich bei nur zwei Patienten ein schwacher Abfall der T 4+ Zellen und damit auch der T 3+ Zellen. OKT 8 blieb in allen Fällen unverändert. Insgesamt boten diese Verläufe keine verwertbaren Veränderungen der gemessenen Subpopulationen.

Eine Zusammenfassung aller unter alleiniger Methylprednisolon und ALG plus Methylprednisolon

Behandlung bestimmten Werte zeigt gegenüber der Kontrollgruppe allerdings deutliche Veränderungen der ALG Gruppe. Der Anteil der OKT 3 und der OKT 4 markierten Zellen war signifikant erniedrigt. Die T 8+ Zellen blieben wiederum unverändert.

Daraus resultiert ebenfalls eine signifikante Verminderung des Verhältnisses von T 4/T 8. Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen anderer Studien (34, 42, 54). Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß die meisten dieser Gruppen ATG verwendeten. Die weitere Entwicklung nach Absetzen der zusätzlichen Therapie konnte mangels verwertbarer Daten nicht analysiert werden. Es wurde aber darüber berichtet, daß ein Anstieg der T 8+ Zellen nach ATG Gabe mit weniger nachfolgenden Abstoßungskrisen einhergehen würde (13, 34, 42). Man führte dies auf eine Induktion von T 8+ Suppressorzellen zurück (154).

Chatenoud et al. (36, 95) stellten dagegen einen gleichmäßigen Abfall aller drei Subpopulationen fest, wobei der Abfall der Gesamt-T-Zellen erstaunlich gering war. Frühere Studien zeigten einen viel drastischeren Rückgang der Gesamt-Lymphozyten sowie der T-Lymphozyten (14). Bei einem Vergleich mit anderen Studien, besonders mit solchen nach Herztransplantation (117), sollte immer auch die unterschiedliche Dosierung bedacht werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann eine selektive Wirkung des ALG in Kombination mit Methylprednisolon gegen T 4+ Zellen abgeleitet werden. Dies stimmt mit Beobachtungen, die unter ATG Gabe gemacht wurden, überein. Eine mögliche Anwendung bei der Beurteilung von Einzelverläufen ergibt sich jedoch aus den Ergebnissen nicht.

In der Cyclosporin-A Gruppe konnte man sich meist auf die Gabe von 3 mal 500 mg Methylprednisolon zur Therapie von Abstoßungskrisen beschränken. Von acht verwertbaren Einzelverläufen boten 6 eine mehr oder weniger deutliche Verminderung der T 3+ und der T 4+ Zellen. Der Anteil der OKT 8 markierten Zellen veränderte sich nur unwesentlich. Der Abfall der Gesamt-T-Zellen bzw. der Helferzellen hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Wirksamkeit der Therapie.

Die Zusammenfassung aller unter zusätzlicher Immunsuppression bestimmten Werte zeigte nur für das Verhältnis von T 4/T 8 unter alleiniger Methylprednisolon Zusatztherapie eine schwache aber signifikante Abnahme im Vergleich zur Cyclosporin-A Kontrollgruppe. Ähnlich wie in der Azathiopringruppe ergab sich unter Cyclosporin-A bei Gabe von 3 mal 500 mg Methylprednisolon eine nicht signifikante Verminderung der T 3+ und T 4+ Zellen. Diese Abnahme wurde in beiden Subpopulationen durch ALG verstärkt. Im Gegensatz zur Azathioprinbehandlung bewirkte die Gabe von ALG unter Cyclosporin-A auch einen Rückgang der T 8+ Zellen. Die ebenfalls bestimmten Werte des monoklonalen Antikörpers 5202 bleiben praktisch unverändert.

In einer kleineren Studie konnten Chatenoud et al. (46) eine relative Erhöhung der T 8+ Zellen unter Corticosteroiden in hoher Dosierung beobachten. Es wurden bisher wenige Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern unter Corticosteroidtherapie durchgeführt, die der hier vorgelegten vergleichbar wären.

Die Theorien zur immunsuppressiven Wirkung der Corticosteroide sind vielfältig. Sie reichen von einer beobachteten Umverteilung der Lymphozyten in den verschiedenen Kompartimenten (57), über eine Suppression der Interleukin 2 Produktion (89) bis

zu der Behauptung, die Wirkung beruhe auf dem unspezifisch antiphlogistischen Effekt dieser Substanzen (153). Vermutlich setzt sich die Wirkung aus mehreren Faktoren zusammen (45). Keine dieser Annahmen steht jedoch im Widerspruch zu dem Ergebnis, daß Steroide eine höchstens geringe selektive Wirkung auf die untersuchten T-Zell Subpopulation haben.

5.1.3 Subpopulationen des mononukleären Konzentrats bei Infektionen der Herpes Viren Gruppe

Im Verlauf unserer Tests wurden Infektionen durch Epstein-Barr-, Cytomegalie- und Herpes Simplex Viren beobachtet.

In einem Fall konnte ein serologischer EBV Titeranstieg mit unseren Werten korreliert werden. Es zeigte sich eine Inversion des Verhältnisses von T 4/T 8 vier Tage nach Abnahme positiver IgM Titer. In den ersten Tagen fiel das Verhältnis auf 0.07 ab und blieb bis zur Entlassung des Patienten 20 Tage lang unter 1.0. Diese Veränderungen beruhten sowohl auf einer relativen Abnahme der T 4+ Zellen, als auch auf einer relativen Zunahme der T 8+ Zellen. Bei einem anderen Patienten wurde nur zu Beginn der serologischen Reaktion eine Bestimmung der Subpopulationen durchgeführt, so daß eine Beurteilung nicht möglich war.

De Waele et al. (48) konnten bei nicht immunsupprimierten Personen zeigen, daß diese Umkehr des Verhältnisses von T 4/T 8 auf einer absoluten Vermehrung der OKT 8 markierten Zellen und weniger auf einer Verminderung des Anteils der T 4+ Zellen beruht. Die proliferierende Subpopulation hat

starke suppressive Eigenschaften gegenüber B-Zellen (137). Ein möglicher zellulärer Mechanismus wäre folgender (85): Im Stadium der Virämie infizieren die Epstein-Barr Viren die B-Lymphozyten. Diese werden dadurch zu polyklonaler Produktion von Gammaglobulinen angeregt (123). Im nächsten Schritt reagiert das zelluläre Immunsystem mit der Aktivierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen und mit verstärkter Suppression dieser B-Zellen. Die Proliferation der zytotoxischen Zellen und Suppressorzellen wird durch den OKT 8 Marker erfaßt.

Eine Erhöhung der Werte Ia positiver Zellen konnte durch unsere Tests nicht gezeigt werden, da in beiden Fällen der monoklonale Antikörper 5202 noch nicht zur Verfügung stand.

Über die Beziehung zwischen CMV und den Veränderungen der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats ist weniger bekannt. Es konnte zwar ebenso eine absolute Vermehrung der T 8+ Zellen mit einer Erhöhung der Suppressoraktivität aber auch eine schwache Verminderung der T 4+ Zellen gezeigt werden (32). Der induzierende Mechanismus blieb bisher ungeklärt. Bei CMV Infektionen von Mäusen wurden sowohl infizierte B-Zellen (116), als auch T-Zellen und Monozyten (27, 86) identifiziert. Diese Infektionen sind aber transient und können nur unter speziellen Laborbedingungen erzeugt werden. Weiterhin wurden zytotoxische T-Zellen gegen infizierte Zellen nachgewiesen, so daß die Erhöhung des Anteils an T 8+ Zellen z.T. auch auf einer Proliferation dieser Subpopulation beruhen könnte (129). Diese Ergebnisse können aber nur sehr bedingt auf den Menschen übertragen werden, da die CMV Infektion bei Mäusen deutlich andere Charakteristika aufweist (85).

Von den 15 Patienten mit serologisch nachgewiesener CMV Infektion wurde in der vorliegenden Untersuchung in 9 Fällen eine Umkehr des Verhältnisses von T 4/T 8 gezeigt. Von 10 Patienten mit signifikantem IgM Titeranstieg waren 7 positiv. Eine genaue Analyse des zeitlichen Zusammenhangs zwischen dem Anstieg des CMV IgM Titers und der Inversion war aufgrund der jeweils nur einmaligen Bestimmung des IgM Titers nicht möglich. Von den Patienten mit einem grenzwertigen IgM Anstieg, aber nachfolgender Bestätigung der Infektion durch deutlichen IgM Anstieg, zeigten nur 2 von 5 eine Umkehrung des Verhältnisses.

Es bieten sich mehrere Erklärungen für die Fälle, bei denen eine Umkehr nicht nachgewiesen werden konnte, an. So wurden in vielen Fällen die Bestimmungen sicher nicht engmaschig genug durchgeführt. Außerdem wurden die IgM Titer im Abstand von wenigstens einem Monat bestimmt. Schließlich können nur wenige zusammenhängende Verläufe der Subpopulationen zusammengestellt werden. Wenn nur die Patienten berücksichtigt werden, bei denen mindestens 2 Bestimmungen im entsprechenden Zeitraum vorhanden sind, dann kann eine Umkehr des Verhältnisses bereits bei 7 von 9 Patienten gezeigt werden. Besonders bei den grenzwertigen IgM Anstiegen müßten die Patienten länger verfolgt werden, da in den beiden positiven Fällen eine Umkehr des Verhältnisses erst 2 Wochen nach dem Titeranstieg nachgewiesen wurde. Eine andere Erklärung könnte sein, daß es verschiedene Formen der CMV Infektion gibt. Es wurde vermutet, daß sich unterschiedliche Syndrome in Bezug auf klinische Symptome, in vitro Funktionen der Lymphozyten und Antikörperproduktion abgrenzen lassen. Ein Zusammenhang mit den Veränderungen der Subpopulationen wurde aber bisher nicht untersucht.

Die Umkehr des Verhältnisses von T 4/T 8 konnte bei unseren Patienten z.T. über 2 Monate verfolgt werden (32). Auffallend ist, daß in den Fällen mit grenzwertigen Titeranstiegen eine Normalisierung des Verhältnisses bereits wieder nach einer Woche eingetreten ist.

Im Gegensatz zu diesen Fällen ergab bei den Patienten mit hohen CMV IgM Titern auch die Bestimmung mit dem monoklonalen Antikörper 5202 signifikante Veränderungen. Bereits bis zu 14 Tagen vor oder 7 Tage nach IgM Anstieg zeigten die entsprechenden Zellen eine deutliche Vermehrung. Da das Antigen aber sowohl auf B-Zellen, als auch auf aktivierten T-Zellen zu finden ist (133, 147, 152), kann auf keine der beiden Subpopulationen rückgeschlossen werden. Als zusätzlicher Hinweis auf Virusinfektionen ist die Bestimmung dennoch nützlich. Der überwiegende Anteil der Patienten mit einer Umkehr des T 4/T 8 Verhältnisses war zum Zeitpunkt des IgM Titeranstiegs seronegativ für CMV in der Komplementbindungsreaktion (148).

Die Erfassung der Herpes Simplex Virus Infektionen ist besonders problematisch. Man kann davon ausgehen, daß die Zahl der Virusausscheider auf 50% nach Transplantation steigt (115), aber es besteht nur eine sehr schwache Korrelation zu den Anstiegen der Antikörpertiter (60). Beide Parameter korrelieren wiederum sehr gering mit klinischen Symptomen (60).

Bei den von uns untersuchten Patienten wurde in 5 Fällen ein signifikanter serologischer Titeranstieg festgestellt. Eine Umkehr des Verhältnisses T 4/T 8 wurde in 3 Fällen beobachtet. Sie konnte bis zu 50 Tage nachgewiesen werden. Die Werte für den MoAk 5202 zeigten zweimal einen mäßigen Anstieg. Beim dritten Patienten macht eine zusätz-

liche CMV Infektion die Bewertung des deutlichen Anstiegs schwierig. Experimentelle Arbeiten weisen jedoch auf die besondere Bedeutung der Ia Antigene bei HSV Infektion hin. Die Replikation der Viren scheint nur in Ia positiven Zellen stattzufinden (20).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt eine leichte Erhöhung der Gesamt-T-Zellen aller drei Infektionen unter T 4/T 8 Umkehr gegenüber den beiden Basistherapiegruppen bei negativer Serologie. Statistisch signifikante Veränderungen der Werte des monoklonalen Antikörpers 5202 konnten nur für die CMV Infektion nachgewiesen werden.

In Bezug auf die praktische Verwertbarkeit der T 4/T 8 Umkehr müssen vier Möglichkeiten unterschieden werden: die richtig positiven Ergebnisse, die richtig negativen, die falsch positiven und die falsch negativen. Alle vier Variationen kommen in unseren Ergebnissen vor. Da bis auf zwei Infektionen alle unter Cyclosporin-A beobachtet wurden, wurden diese vier Möglichkeiten für die Cyclosporin-A Therapie genauer analysiert. Die falsch positiven Ergebnisse - also die Umkehr bei negativer Serologie - unterscheiden sich bei den gemessenen Parametern in einigen Punkten von einer Umkehr unter Virusinfektion. So ist die Anzahl der Gesamt-T-Zellen auch hier geringer als bei Virusinfektionen. Die relative Abnahme der T 4+ Zellen ist in beiden Fällen etwa gleich. Der Anstieg der OKT 8 markierten Zellen hingegen ist unter Virusinfektionen viel deutlicher. Bei negativer Serologie wurde deshalb nie ein Wert unter 0.6 für das Verhältnis von T 4/T 8 erreicht. Dieser Grenzwert wurde aber bei allen länger beobachteten Virusinfektionen deutlich unterschritten. Ein weiterer

Unterschied zeigte sich bei den Ia+ Zellen. Bei den meisten Patienten war ein deutlicher Anstieg unter Virusinfektionen zu erkennen, so daß auch eine durchschnittliche signifikante Erhöhung gegenüber den seronegativen Fällen daraus resultierte. Eine Analyse des klinischen Verlaufs zeigte für die Fälle einer Umkehr ohne Virusinfektion unter Cyclosporin-A Therapie keine Besonderheiten. Es wurden allerdings einige mögliche Einflüsse wie z.B. Hepatitis-B Infektionen (31) nicht untersucht. Unter Azathioprin wurde aber eine Umkehr ohne Virusinfektion nur nach ALG Gabe beobachtet (55).

Ein Absinken des Verhältnisses $T\ 4/T\ 8$ unter 0.6 bei stark betontem Anstieg der $T\ 8+$ Zellen und eine Vermehrung der Ia+ Zellen um etwa 100% sind nach den vorliegenden Ergebnissen auch unter Cyclosporin-A ausreichende Hinweise für eine Infektion der Herpes Virus Gruppe.

Auf die falsch negativen Werte wurde in der Diskussion der CMV Infektionen bereits hingewiesen. Eine bessere Bewertbarkeit dieser Fälle wäre nur bei wesentlich häufigerer Bestimmung der IgM Titer oder anderer Parameter möglich. Das Argument grundsätzlich verschiedener Infektionsmodi, welche einmal mit einer Umkehr des Verhältnisses $T\ 4/T\ 8$ und anderer immunologischer Phänomene einhergehen im anderen Fall aber nicht, kann aus den zur Verfügung stehenden Unterlagen nicht geklärt werden. Dazu wären verschiedene Funktionstests und am besten eine prospektiv angelegte Studie nötig.

Andere Arbeitsgruppen beschränken sich nicht nur auf die Korrelation mit serologischen Titerveränderungen. Zusätzlich zur Serologie wurden der Virusnachweis (37), die Beurteilung zytoplasmatischer Einschlüsse (148) oder sogar klinische Symp-

tome (18) hinzugezogen. Mit der Vermischung dieser Befunde haben diese Arbeitsgruppen aber auch darauf verzichtet, selektive Zusammenhänge einzelner Faktoren mit der T 4/T 8 Umkehr herauszuarbeiten. Die meisten Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß die Berechnung des Verhältnisses von T 4/T 8 einen wertvollen Parameter zur schnellen Diagnose einer Virusinfektion der Herpes Virus Gruppe darstellt. Ein wichtiger Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Bestimmungen zur Virusdiagnose, wie etwa Serologie oder Viruskultur besteht darin, daß die Ergebnisse innerhalb weniger Stunden vorliegen. Ein weiterer, für den Kliniker aufschlußreicher Aspekt ist der Hinweis auf eine allgemeine Abwehrschwäche unter T 4/T 8 Umkehr. So könnten die früher schon beobachteten häufigen Sekundärinfektionen unter CMV Infektion (142) durch die Veränderungen der lymphozytären Subpopulationen begünstigt werden (148). Bei anderen Syndromen mit einem niedrigen T 4/T 8 Verhältnis wie etwa dem AIDS sind solche opportunistischen Infektionen geradezu charakteristisch (64, 108). Unabhängig von der Ursache der T 4/T 8 Umkehr sollte der Kliniker also in einer solchen Periode besonderes Augenmerk auf die Möglichkeit einer Sekundärinfektion legen.

5.2 Diskussion der Untersuchungen im Feinnadel-aspirat (FNA)

Die Differenzierung der Zellen im FNA mit Hilfe der zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper betrifft hauptsächlich lymphozytäre Subpopulationen. Eine Einteilung der Ergebnisse nach den zytologischen Kriterien des "corrected increment" (70) zeigt die deutliche Zunahme der Lymphozyten mit ansteigender Inflammation des Transplantats.

Bei niedrigen Inflamationsgraden entspricht die Anzahl der Lymphozyten im Aspirat den T 3+ Zellen. Es handelt sich also überwiegend um T-Lymphozyten. Bei stärkerer Infiltration bleiben die T 3+ Zellen hinter der Zahl der Gesamt-Lymphozyten zurück. Dies entspricht den Beobachtungen verschiedener Untersuchungen, nach denen auch B-Zellen (158) und "large granular lymphocytes" (173) in das Transplantat einwandern.

Die Auswertung der T-Zell Subpopulationen zeigt, daß deren Anstieg hauptsächlich auf einer Zunahme der T 8+ Zellen beruht. Bei starker Inflammation waren durchschnittlich 3 bis 4 mal soviel T 8+ als T 4+ Zellen im Aspirat zu finden, während das Verhältnis dieser Subpopulationen im peripheren Blut etwa ausgeglichen war. In einigen Fällen waren die T 8+ Zellen im FNA derart dominierend, daß es viel anschaulicher war, in den Ergebnissen nicht wie im peripheren Blut das Verhältnis T 4/T 8 sondern das Verhältnis T 8/T 4 anzugeben (128). Besonders die graphische Darstellbarkeit wurde durch diese Änderung wesentlich verbessert.

Eine genaue Analyse der Ergebnisse ist erst nach einer differenzierteren Auswertung, besonders nach einer Trennung zwischen viruspositiven und virusnegativen Fällen möglich.

5.2.1 Subpopulationen im FNA bei negativer Virus-serologie

Eine Markierung der lymphozytären Subpopulationen im Aspirat unter Azathioprin-Basistherapie zeigte auch die in der Übersicht oben bereits besprochene Dominanz der T-Zellen im Infiltrat des Transplantats. Der Anstieg dieser T 3+ Zellen war hauptsächlich durch eine Zunahme der T 8+ Zellen bedingt. In diesen Fällen zeigte sich mit steigender Inflammation auch ein schwacher Anstieg der T 4+ Zellen. Von diesen Veränderungen blieben die Subpopulation im peripheren Blut unbeeinflusst.

Durch die Ausklammerung der Virusinfektionen wurde in diesen Fällen versucht, nur solche Infiltrationen zu erfassen, die einer Abstoßungsreaktion entsprachen. Nicht durch Abstoßungsreaktionen oder Virusinfektionen bedingte Infiltrationen im Sinne von sog. unspezifischen Nephritiden, wie in anderen Arbeiten erwähnt (128), konnten in dieser Untersuchung nicht verifiziert werden. Die bei Abstoßungskrisen beobachtete Zunahme der T-Zellen mit einem durchschnittlichen Überwiegen der OKT 8 positiven Zellen wurde in mehreren Studien bestätigt (59, 81, 128). Unterschiede in den relativen Anteilen der leukozytären Subpopulationen erklären sich aus selektiven Verlusten während der zytologischen Bearbeitung oder der Gewinnung von Zellen aus der Suspendierung von Transplantaten gegenüber den histologischen Methoden. Außerdem wurden für die Auszählung in histologischen Präparaten z.T. verschiedene Kriterien angewandt (128, 164). Für die Dominanz der T 8+ Zellen unter den T-Lymphozyten während der Abstoßungskrisen können sowohl die zytotoxischen Zellen als auch die Suppressorzellen verantwortlich zeichnen. Für erstere

Subpopulation sprechen experimentelle Befunde, die eine donorspezifische T-Zell vermittelte Zytotoxizität in verschiedenen Transplantaten nachweisen konnten (7, 30, 151). Diese im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse sollten jedoch nur mit Vorsicht auf humane Bedingungen übertragen werden (68). Die meisten Aussagen beziehen sich außerdem auf frühe akute Abstoßungsreaktionen. Über chronische Abstoßungsreaktionen liegen in dieser Richtung keine Befunde vor. Neuere Untersuchungen am Menschen mit dem angeblich für zytotoxische T-Zellen spezifischen Antikörper OKT 8a sprechen aber ebenfalls für diese Version (164).

In anderen Studien (77) konnte aber auch eine verstärkte Suppressoraktivität nach Transplantation nachgewiesen werden. Ein dazu passendes Konzept geht davon aus, daß die zytotoxischen Effektorzellen hauptsächlich Makrophagen und "natural killer cells" seien (105). Die Einwanderung oder Proliferation von Suppressorzellen könnte dann erfolgen, um diese Mechanismen zu regulieren und in Schranken zu halten. Beide Modelle beleuchten vermutlich jeweils Einzelaspekte einer sehr komplexen Reaktion. Es spricht auch nichts dagegen, daß je nach Bedarf beide Möglichkeiten verwirklicht werden. Dabei wäre es vorstellbar, daß Transplantate mit einem Überwiegen der Suppressorzellen eine andere Prognose haben als Organe mit überwiegend zytotoxischen T-Zellen.

Bei Zugabe von ALG zur Azathioprin Basistherapie zeigten sich Abweichungen in der Zusammensetzung des Infiltrats, die dafür sprechen, daß hier eine Modifikation der sonst beobachteten Abstoßungsreaktion stattfand. Mit der steigenden Inflammation war nur ein geringer Anstieg der T-Lymphozyten verbunden; d.h. es sind in diesen Fällen andere Zellen eingewandert oder haben proliferiert, da

ja ein hohes "corrected increment" erreicht wurde. Von den T-Zell Subpopulationen wurden die T 4+ Zellen von der Wirkung des ALG am meisten betroffen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen im peripheren Blut. Im weiteren klinischen Verlauf konnte bei den Patienten mit hoher Inflammation trotz ALG Gabe keine Besonderheit festgestellt werden. In drei Fällen zeigte die Histologie eine chronische Abstoßungsreaktion.

Unter Cyclosporin-A-Therapie war der Anstieg der T-Lymphozyten im Transplantat ebenfalls etwas geringer als unter reiner Azathioprin Basistherapie. Auch hier wurde ein mit dem Abstoßungsgrad zunehmendes durchschnittliches Übergewicht der T 8+ Zellen festgestellt. Die Markierung mit dem monoklonalen Antikörper 5202 zeigte einen leichten Anstieg der Ia+ Zellen bei hohen Abstoßungsgraden. Wiederum ergaben sich im peripheren Blut keine vom Inflammationsgrad des Transplantats abhängigen Veränderung dieser Subpopulation. Eine zusätzliche Therapie mit Methylprednisolon zeigte im Falle weiterbestehender Inflammationen keine Besonderheiten in der Zusammensetzung der lymphozytären Subpopulationen. Auch die weiteren klinischen Verläufe waren unauffällig. Es scheint sich nur um ein verzögertes Ansprechen der Inflammation auf die Steroidtherapie gehandelt zu haben.

5.2.2 Überwiegen der T 4+ Zellen im Feinnadelaspirat

Bei den untersuchten Feinnadelaspiraten waren auch einige Fälle, bei denen der Anteil der T 4+ Zellen größer war als der der T 8+ Zellen. Genauer untersucht wurden nur die Fälle mit starker Inflammation, da bei geringer Anzahl der einzelnen Subpopulationen schon statistische Schwankungen der Zählung die Berechnungen verfälschen können. Unter 47 Feinnadelaspiraten mit einem "corrected increment" über 2.5 und bei negativer Virusserologie waren 8 Fälle, in denen die T 4+ Zellen dominierten. In nur 2 dieser Fälle war eine nachfolgende zusätzliche Therapie erforderlich. Bei den Patienten mit einem Überwiegen der OKT 8 markierten Zellen im Transplantat war in 32 von 39 Fällen eine Zusatztherapie oder sogar eine Explantation angezeigt. Nach diesen Ergebnissen befinden sich die Patienten mit vorwiegend T 4+ Zellen im Aspirat trotz hoher Inflammation in einer günstigeren aktuellen klinischen Situation. Bei der Überprüfung der klinischen Langzeitergebnisse konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen herausgearbeitet werden.

Von Willebrand et al (171) beobachteten im Gegensatz dazu bei Fällen mit hohem T 4+ Anteil im Transplantat gehäuft irreversible Abstoßungskrisen. Van Es et al (164) berichten sogar von einer Dominanz dieser Subpopulation in den meisten ihrer histologischen untersuchten Organe mit einer schlechten Prognose im Falle des T 8+ Überwiegens. Dabei unterscheidet diese Arbeitsgruppe allerdings zwischen interstitieller und perivaskulärer Infiltration. Diese Einteilung kann mit zytologischen Methoden natürlich nicht nachvollzogen werden, weshalb ein Vergleich mit dieser Arbeit ausgeschlossen ist.

Aufgrund dieser verschiedenen Ergebnisse stellt sich allgemein die Frage, inwiefern durch das Vorherrschen der einen oder der anderen Subpopulation jeweils verschiedene Arten von Abstoßungsreaktionen repräsentiert werden. Es gibt dazu mehrere Arbeiten, die zeigen konnten, daß es verschiedene zytotoxische T-Zelllinien gibt, unter anderem auch T 4+ Zellen (96, 175). Dabei scheint die Zytotoxizität der T 4+ Zellen, wie auch andere Aktivitäten (61) dieser Subpopulation an bestimmte HLA-DR Antigene auf den Zielzellen gebunden zu sein. Es läge also die Vermutung nahe, daß die Dominanz der T 4+ Zellen im Transplantat gehäuft in den Fällen vorkommt, in denen ein hohes HLA-DR "mismatch" zwischen Spender und Empfänger vorhanden ist. Eine entsprechende Untersuchung unserer Ergebnisse reflektierte aber keine Abhängigkeit des Anteils dieser Zellen im Aspirat von den HLA "mismatches".

Zusammenfassend konnten wir also bei den Fällen mit negativer Virusserologie im Feinnadelaspirat zwei verschiedene Muster der Zusammensetzung der Phänotypen lymphozytärer Subpopulationen darstellen. In den meisten Fällen dominierten die T 8+, in einigen aber auch die T 4+ Zellen. Im ersten Fall könnte man - bisher leider nur theoretisch - zwischen Suppressor- und zytotoxischen Zellen unterscheiden. Daraus würden also drei mögliche Muster der lymphozytären Infiltration resultieren. Es gibt einige Anzeichen dafür, daß sich daraus auch unterschiedliche Einflüsse auf die Prognose eines Transplantats ergeben.

5.2.3 Lymphozyten-Subpopulationen im Feinnadelaspirat bei Virusinfektionen der Herpes Viren Gruppe

Bei 6 von 21 Patienten mit einer Infektion durch Viren der Herpesgruppe wurde in der Feinnadelaspirationszytologie eine starke Inflammation des Transplantats festgestellt. Alle zeigten im peripheren Blut eine Umkehr des Verhältnisses von T 4/ T 8. Da aber nicht alle 21 Patienten regelmäßig durch Feinnadelbiopsien kontrolliert wurden, ist es möglich, daß der Anteil der Patienten mit einer Infiltration des Transplantats unter Virusinfektion etwas höher wäre.

Bei den infiltrierenden Zellen dominierten in 10 untersuchten Aspiraten die T-Zellen mit 35% noch deutlicher als bei Inflammation während negativer Virusserologie. Diese T-Zellen rekrutierten sich zu 85% aus T 8+ Zellen. Im Vergleich zu einigen Fällen mit niedrigeren Inflamationsgraden blieb der Anteil der OKT 4 markierten Zellen mit etwa 5% aller Leukozyten des Aspirats konstant. In Einzelfällen konnte sogar eine relative Abnahme dieser Subpopulation beobachtet werden. Der Anteil der Ia+ Zellen war mit 19% ebenfalls wesentlich höher als bei negativer Virusserologie.

Ein Vergleich der Befunde mit hoher Inflammation bei positiver oder negativer Virusserologie zeigt im Aspirat 3 signifikante Unterschiede. Bei Virusinfektion sind die Gesamtlymphozyten, die Gesamt-T-Zellen und die T 8+ Zellen gegenüber den Fällen bei negativer Serologie deutlich erhöht. Im peripheren Blut sind dabei die Gesamtlymphozyten und die T 8+ Zellen erhöht, während der relative Anteil der OKT 4 markierten Zellen vermindert ist. Unter Berücksichtigung dieser Parameter ist es

also möglich, eine Inflammation bei Virusinfektion von einer Inflammation bei negativer Virusserologie zu unterscheiden.

Es stellt sich demnach die Frage, ob es sich bei diesen Infiltraten um eine spezielle Form der Abstoßungsreaktion oder um eine Reaktion anderer Art handelt. Die Information aus der Auswertung der klinischen Verläufe unserer 6 Patienten ist durch die geringe Anzahl limitiert. Trotzdem fällt auf, daß zumindest bei drei Patienten eine Abstoßungsbehandlung nicht erforderlich, in einem Fall sicher schädlich war. Zwei der Patienten wurden nicht zusätzlich immunsupprimiert und ihr weiterer Verlauf war komplikationslos. Diese Befunde sprechen eher dagegen, daß wir es hier mit Abstoßungsreaktionen zu tun hatten. Die aufgetretene Organverschlechterung kann unter anderem auch so erklärt werden, daß zumindest in zwei der Fälle im histologischen Präparat Veränderungen an den Glomeruli beschrieben wurden. Solche Befunde wurden von Richardson et al. (138) im Sinne einer Glomerulopathie sehr häufig im Zusammenhang mit CMV Infektionen beobachtet. Weiterhin wurde vom Pathologen in einigen Fällen auf eine Begleitnephritis bei Virusinfektion hingewiesen. Falls es sich bei den T 8+ Zellen um zytotoxische Zellen handelt, könnten diese der Vernichtung infizierter Parenchymzellen dienen (120).

Man muß aber auch daran denken, daß zu der Virusinfektion eine Abstoßungsreaktion hinzukommen kann. Es wurde sogar angenommen, daß durch Virusinfektionen Abstoßungskrisen - oder umgekehrt - "getriggert" werden (104). In den von uns untersuchten Fällen der vermutlich virusspezifischen Inflammation - aufgrund des uniformen Musters und

der daraus sich ergebenden Unterschiede zu den Abstoßungskrisen - wurden aber keine Anzeichen einer zusätzlichen Abstoßungsreaktion verifiziert. In solchen Fällen könnte man also auf eine zusätzliche Immunsuppression verzichten. Gerade bei Virusinfektionen wäre dies besonders erstrebenswert, da eine zusätzliche Schwächung der Abwehrkräfte den Verlauf der Infektion natürlich verschlechtert und das Auftreten von sekundären, opportunistischen Infektionen begünstigt (121, 142, 144).

6. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an 103 Patienten nach Nierentransplantation durchgeführt. Es wurden die Subpopulationen von 400 mononukleären Konzentraten des peripheren Blutes und die Subpopulationen der mononukleären Zellen von insgesamt 300 Feinnadelaspiraten mit folgenden monoklonalen Antikörpern markiert: OKT 3 (Gesamt-T-Zellen), OKT 4 (Helfer Zellen), OKT 8 (Suppressor-/zytotoxische Zellen), OKM 1 (myeloische Zellen) und Oy Medix 5202 (Ia pos. Zellen).

Die Auswertung der Untersuchungen im peripheren Blut brachte folgende Ergebnisse:

Die Werte der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats von Normalpersonen stimmten mit den Angaben der entsprechenden Literatur überein. Die Azathioprin Basistherapie führte zu einer relativen Verminderung der lymphozytären Subpopulationen gegenüber den Normalwerten. Es zeigte sich eine Erhöhung des Mittelwertes des Verhältnisses von T 4/T 8 und eine weite Streuung der Einzelwerte. Diese Verminderung des Anteils der lymphozytären Subpopulationen am mononukleären Konzentrat war unter Cyclosporin-A Therapie noch verstärkt. Das Verhältnis T 4/T 8 blieb gegenüber Normalwerten unverändert. Die Verläufe der lymphozytären Subpopulationen einzelner Patienten zeigten in beiden Therapiegruppen große interindividuelle Unterschiede.

Ein Zusammenhang zwischen aktuellen Veränderungen der Subpopulationen des mononukleären Konzentrats und darauffolgenden Abstoßungskrisen konnte nicht festgestellt werden.

Eine Abstoßungstherapie mit ALG und Methylprednisolon verminderte selektiv den Durchschnittswert der T 4+ Zellen des peripheren Blutes. Eine Therapie mit hohen Dosen Methylprednisolon allein brachte ebenfalls eine geringe, aber nicht signifikante Verminderung dieser Subpopulation. Bei serologischen Titeranstiegen im Sinne von Epstein-Barr Virus-, Cytomegalievirus- und Herpes Simplex Virusinfektionen konnte in 13 von 22 Fällen eine Umkehr des Verhältnisses T 4/T 8 nachgewiesen werden. Bei engmaschiger Beobachtung ist der Anteil deutlich höher.

Bei der Bestimmung der Subpopulationen der mononukleären Zellen der Feinnadelaspirate wurde folgendes festgestellt:

Etwa 60% der Markierungen der Aspirate lieferten verwertbare Ergebnisse. Die Infiltrate bei Abstoßungskrisen sind durch einen hohen Anteil an T-Zellen gekennzeichnet. Es wurden zwei unterschiedliche Inflammationsmuster beobachtet. In den meisten Fällen dominierten die T 8+ Zellen, in einigen aber die T 4+ Zellen. In den letztgenannten Situationen scheint die Inflammation kaum mit einer akuten Schädigung des Transplantats einherzugehen.

Unter ALG Gabe wird der Anteil der T-Zellen, besonders der T 4+ Zellen, am Infiltrat deutlich zurückgedrängt.

Auch unter Cyclosporin-A Therapie war der Anstieg der T-Zellen bei Abstoßungskrisen im Vergleich zur Azathioprintherapie geringer.

Infiltrate im Transplantat wurden auch bei Virusinfektionen festgestellt. Die Inflammation wurde dabei in noch stärkerem Maße von T 8+ Zellen beherrscht. Es zeigte sich auch eine deutliche Vermehrung der Ia+ Zellen. Abstoßungstherapieversuche

hatten in diesen Fällen wenig Erfolg, so daß man in Erwägung ziehen muß, daß es sich um virusbedingte und nicht um abstoßungsbedingte Infiltrate handelte. Bei einer Trennung dieser beiden Möglichkeiten kann überflüssige und gefährliche zusätzliche Immunsuppression vermieden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ABDOU, N.I., ZWEIMANN, B., CASELLA, S.R.:
Effects of azathioprine therapy on bone marrow-dependent and thymus-dependent cells in man.
Clin. Exp. Immunol., 13, 1973: 55-64
- (2) AH-KAU, N.G., YU-HUI ZHANG, RUSSO, C., FERRONE, S.:
Immunochemical and functional analysis of Ia-like antigens on human monocyte-macrophages with monoclonal antibodies.
Cellular Immunology 66, 1982: 78-87
- (3) AHONEN, J., HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E., EKLUND, B., LINDSTRÖM, L.:
Impact of methylprednisolon on first renal allograft rejection.
Transplant. Proc. Vol. XIII, No.1., 1981: 328-331
- (4) ALBERT, E., SCHOLZ, S.:
Das Haupthistokompatibilitätssystem (HLA) des Menschen: Serologie, Genetik und klinische Bedeutung.
Immunforschung in Klinik und Labor
Fresenius Stiftung, 1979: 77-105
- (5) ALEXANDRE, G.P.J., MURREY, J.E.:
Further studies of renal homotransplants in dogs treated by combined Imuran therapy.
Surg. Forum 13, 1962: 64-67
- (6) ALEXANDRE, G.P.J., WONIGEIT, K., BUNZENDAHL, H.:
Immunsuppression.
Transplantationschirurgie, hrsg. v. R. Pichlmayr, Springer-Verlag, 1981: 212-228
- (7) ASCHER, N.L., FERGUSON, R.M., HOFFMAN, R., SIMMONS, R.L.:
Partial characterization of cytotoxic cells infiltrating sponge matrix allografts.
Transplantation, Vol.27, 1979: 254-259
- (8) AX, W.:
Monoklonale Antikörper durch Lymphzyten-Hybridisierung.
Laboratoriumsblätter 30, Behringwerke AG, 1980: 89-99
- (9) BACH, J.F.:
Immunsuppression by chemical agents.
Transplant. Proc. Vol. III, 1971: 27-33

- (10) BACH, M.A., BACH, J.F.:
Activities of immunosuppressive agents in vitro: II. Different timing of azathioprine and methotrexate in inhibition and stimulation of mixed lymphocyte reaction.
Clin. Exp. immunol. 11, 1972: 89-98
- (11) BEGEMANN, H.:
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag, 1982
- (12) BERTOUCHE, J.V., ROBERTS-THOMSON, P.J.,
BRADLEY, J.:
Diurnal variation of lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies.
Brit. Med. J. Vol.286, 1983: 1171-1172
- (13) BRINKLEY, W.F., VALENZUELA, R., BRAUN, W.E.,
DOLDHAR, S.D., NOVICK, A.C., STEINMÜLLER, D.R.:
Flow cytometry quantitation of peripheral blood T-cell subsets in human renal allograft recipients.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983: 1163-1165
- (14) BISHOP, G., COSIMI, A.B., VOYNOW, N.K.,
WELCHER, J.D., WORTIS, H.H.:
Effect of immunosuppressive therapy for renal allograft on the number of circulating sheep red blood cell rosetting cells.
Transplantation, Vol.20, No.2, 1975: 123-129
- (15) BÖYUM, A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigations, Vol.21 Suppl.97: 77-89
- (16) BOREL, J.F.:
Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity.
Immunology 31, 1976: 631-641
- (17) BOREL, J.F.:
Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals.
Immunology 32, 1977: 1017-1025
- (18) BRANDO, B., CIVATI, G., GRILLO, C.,
BUSNACH, G., COLUSSI, G., BROGGI, M.L.,
MINETTI, L.:
Immunological monitorings of viral infections in renal transplant recipients.
Proc. EDTA Vol.20, 1983: 265-270

- (19) BRAUN, J., SHAAFI, R., UNANUE, E.:
Cross-linking by ligands to surface
immunoglobulin triggers mobilisation of
intracellular Ca^{++} in B-lymphocytes.
J. Cell. Biol. 82, 1979: 755-766
- (20) BRAUN, R.W., TENDE, H.K., KIRCHNER, H.,
MUNK, K.:
Replication of herpes simplex virus in
human T lymphocytes:
Characterisation of the viral target cell.
J. Immunol. Vol.132, No.3, 1984: 914-919
- (21) BRÄUTIGAM, A.R., DUTLOO, F.J., OLDING,
L.B., OLDSTONE, M.B.A.:
Pathogenesis of murine CMV infection: The
macrophage as a permissive cell for CMV
infection, replication and latency.
J. Gen. Virol. 44, 1979: 359-369
- (22) BREARD, J., REINHERZ, E.L., KUNG, P.C.,
GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMANN, S.F.:
A monoclonal antibody reactive with human
peripheral blood monocytes.
J. Immunol. Vol.124, No.4, 1980: 1943-1948
- (23) BRENDEN, W.:
The clinical use of ALG.
Transplant. Proc. Vol. III, 1971: 280-286
- (24) BRENDEN, W.:
Antilymphozytenglobulin heute.
Münchener Medizinische Wochenschrift 115,
1973: 241-248
- (25) BRENDEN, W., SEIFERT, J., RING, J.:
Die klinische Anwendung von Antilympho-
zytenglobulin.
Münchener Medizinische Wochenzeitschrift
117, 1975: 1361-1368
- (26) BRITTON, S., PALACIOS, R.:
Cyclosporin-A: Usefulness, risks and
mechanism of action.
Immunol. Rev., Vol.65, 1982: 5-22
- (27) BUCHANAN, J.M.:
The enzymatic synthesis of the purine
nucleotides.
Harvey Lect. 54, 1958-59: 104-130
- (28) CALNE, R.Y., WHITE, D.J.G., THIRU, S.:
Cyclosporin A in patients receiving renal
allografts from cadaver donors.
Lancet 2, 1978: 1323-1327

- (29) CALNE, R.Y.:
Immunosuppression - Adaptation of
laboratory experience to clinical practice.
Praxis der Nierentransplantation, hrsg. v.
Albert, F.W.,
Schattauer Verlag 1980: 69-77
- (30) CANDY, T.G., WUNDERLICH, J.P.:
Quantitative assessment of cellular and
humoral responses to skin and tumor
allografts.
Transplantation, Vol.11, 1971: 111-116
- (31) CARELLA, G., CHATENOUD, L., DEGOS, F.,
BACH, A.-M.:
Regulatory T-cell subset imbalance in
chronic active hepatitis.
J. Clin. Immunol. 2, 1982: 93-100
- (32) CARNEY, W.P., RUBIN, R.H., HOFFMANN, R.A.,
HANSEN, W.P., HEALEY, C., HIRSCH, M.S.:
Analysis of T-lymphocyte subsets in CMV
mononucleosis.
J. Immunol. Vol.126, 1981: 2114-2116
- (33) CARTER, N.P., CULLEN, P.R., THOMPSON, J.F.,
BEWICK, A.L.T., WOOD, R.F.M., MORRIS, P.J.:
Monitoring lymphocyte subpopulation in
renal allograft recipients.
Transplant Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
1157-1159
- (34) CARVER, M., THOMAS, F., DEEPE, R., WARREN,
R., THOMAS, J.:
Selective action of rabbit ATG on OKT 4
positive T-cell subsets in rhesus monkeys.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
627-629
- (35) CHANG, T.W., KUNG, P., GINGRES, S.P.,
GOLDSTEIN, G.:
Does OKT 3 monoclonal antibody react with
an antigen-recognition structure on human
T-cells?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1981:
1805-1808
- (36) CHATENOUD, L., KREIS, H., JENGERS, P.,
BACH, J.F.:
The effect of immunosuppressive agents on
T-cell subpopulations, as evaluated by use
of monoclonal antibodies.
Transplant. Proc. Vol. XIII, No.3, 1981:
1651-1656

- (37) CHATENOU, L., CHKOFF, N., KREIS, H., BACH, J.F.:
Interest in and limitation of monoclonal anti-T-cell antibodies for the follow-up of renal transplant patients.
Transplantation, Vol.36, No.1, 1983: 45-50
- (38) CHATENOU, L., BERRIH, S., BENE, M.-C., KREIS, H., BACH, J.F.:
The effects of immunomodulation on peripheral T-cell subsets.
J. Clin. Immunol. Vol.2, No.3, Suppl. July 83: 61S-66S
- (39) COLVIN, R.B., COSIMI, A.B., BURTON, R.C., DELMONICO, F.L., JAFFERS, G., RUBIN, R.H., TOLKOFF-RUBIN, N.E., GIORGIV, J.V., MC CHESLOY, R.T., RUSSEL, P.S.:
Circulating T-cell subsets in 72 human renal allograft recipients: The OKT 4+/OKT 8+ cell ratio correlates with reversibility of graft injury and glomerulopathy.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983: 1166-1169
- (40) COSIMI, A.B., WORTIS, H.H., DELMONICO, F.L., RUSSEL, P.S.:
Randomized clinical trial of antithymocyte globulin in cadaver renal allograft recipients: Importance of T-cell monitoring.
Surgery Vol.80, No.2, 1976: 155-163
- (41) COSIMI, A.B., DELMONICO, F.L., BURDICK, J.F., RUSSEL, P.S.:
Individualized management of immunosuppression according to serial monitoring of immunocompetence.
Transplant. Proc. 10, 1978: 647-650
- (42) COSIMI, A.B., COLVIN, R.B., BURTON, R.C., RUBIN, R.H., GOLDSTEIN, G., KUNG, P.C., HANSEN, W.P., DELMONICO, F.L., RUSSEL, P.S.:
Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts.
N. Engl. J. Med. Vol.302, No.6, 1981: 308-314
- (43) COSIMI, A.B.:
The clinical value of antilymphocyte antibodies.
Transplant. Proc. Vol. XIII, No.1, 1981: 462-468

- (44) COSIMI, A.B., COLVIN, R.B., BURTON, R.C.,
WINN, H.J., RUBIN, R., GOLDSTEIN, G., KUNG,
P.C., HOFFMANN, R.A., HANSEN, W.P., RUSSEL,
P.S.:
Immunologic monitoring with monoclonal
antibodies to human T-cell subsets.
Transplant. Proc. Vol. XIII, No.3, 1981:
1589-1593
- (45) CUPPS, T.R., FAUCI, A.S.:
Corticosteroid-mediated immunoregulation in
man.
Immunol. Rev. Vol.65, 1982: 133-155
- (46) CUPPS, T.R., EDGAR, L.C., THOMAS, C.A.,
FAUCI, A.S.:
Multiple mechanisms of B-cell immuno-
regulation in man after administration of
in vivo corticosteroids.
J. Immunol. Vol.132, No.1, 1984: 170-174
- (47) DESPONT, J.P., STEIMER, F., BANDERET, E.:
Functional and biochemical characteristics
of human "null" lymphoid cells.
Transplantation, Vol.31, No.4: 251-256
- (48) DE WAELE, M., THIELEMANS, C., VAN CAMP,
B.K.G.:
Characterisation of immunoregulatory
T-cells in EBV induced infections mono-
nucleosis by monoclonal antibodies.
N. Engl. J. Med. Vol.304, No.8, 1981:
460-462
- (49) DIMITRIU, A., FAUCI, A.S.:
Activation of human B-lymphocytes:
Differential effects of azathioprine on
B-lymphocytes and lymphocyte subpopulations
regulating B-cell function.
J. Immunol. Vol.121, 1978: 2335-2339
- (50) DOCUMENTA GEIGY:
Wissenschaftliche Tabellen
Georg Thieme Stuttgart, 1975: 32-34
- (51) DORE', C.f., BALFOUR, B.M.:
A device for preparing cell spreads.
Immunology 9, 1965: 403-405
- (52) DOS REIS G.A., SHEVACH, E.M.:
Effect of CsA on T-cell function in vitro:
The mechanism of suppression of T-cell
proliferation depends on the nature of the
T-cell stimulus as well as the differen-
tiation state of the responding T-cell.
J. Immunol. Vol.129, No.6, 1982: 2360-2367

- (53) ELION, G.B., HITCHINGS, G.H.:
Azathioprine
Handbuch der experimentellen Pharmakologie,
hrsg. v. O. Eichler, A. Farah, H. Herken,
A.D. Welch, Springer-Verlag 1975, 404-425
- (54) ELLIS, T.M., LEE, H.M., MOHANAKUNAR, T.:
Alterations in human regulatory T lympho-
cyte subpopulations after renal allo-
grafting.
J. Immunol. Vol.127, 1981: 2199-2203
- (55) ELLIS, T.M., MOHANAKUMAR, T., MUAKASSA, W.,
LOWER, R.R., LEE, H.M.,
Influence of immunosuppressive therapy and
blood transfusion on human T-cell sub-
populations.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
1173-1175
- (56) EWALD, R.W.:
Die direkte serologische Crossmatch-Reak-
tion vor Nierentransplantation.
Praxis der Nierentransplantation, hrsg. v.
Albert, F.W.,
Schattauer Verlag, Stuttgart, 1980, 41-52
- (57) FAUCI, A.S., DALE, D.C.:
The effect of hydrocortisone on the
kinetics of normal human lymphocytes.
Blood 46, 1975: 235-243
- (58) FAUCI, A.S.:
Immunosuppressive and anti-inflammatory
effects of glucocorticoids.
Monographs on endocrinology, Vol.12, 1979:
449-465
- (59) FORSUM, U., CLAESSON, K., FRÖDIN, L.,
PARRA-KARLSSON, A., KLARESHOG, L., ODLIND,
B., STENKVIST, B., TUFFESON, G.:
Methods for monitoring T-lymphocyte subsets
in renal allografts.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.2, 1983:
1178-1181
- (60) FORTIER, B., NICHOLAS, J.C., BURGUIERE,
A.M., HURAUX, J.M., BROUT, F.:
Renal transplantation and viral infections
IV: A survey of herpes simplex excretion in
relation to cellular specific immunity and
humoral immunity among renal transplant
recipients.
Biomedicine, 28, 1978: 328-332

- (61) FRIEDMAN, D.M., THOMPSON, G.S., PRINCIPATO, M.A.:
Allospecific human T-cell lines and clones which mediate HLA-DR restricted helper activity.
J. Immunol. Vol.129, No.6, 1982: 2451-2457
- (62) FU, S.M., CHIORAZZI, N., WANG, C.Y., MONTAZERI, G., KUNKEL, H.G., KO, H.S., GOTTLIEB, A.B.:
Ia-bearing T-lymphocytes in man. Their identification and role in the generation of allogeneic helper activity.
J. Exp. Med. 148, 1978: 1423-1428
- (63) GOLDSTEIN, G.:
T-cells and immunoregulation: A contemporary overview.
J. Clin. Immunol., Vol.2, 1982: 5S-7S
- (64) GOTTLIEB, M.S., SCHROFF, R., SCHAUER, H.M.:
Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.
N. Eng. J. Med., 305, 1981: 1425-1431
- (65) GRZELAK, I., OLSZEWSKI, W.L., ENGESET, A., KOLSTAD, P.:
Monoclonal antibody classification of blood immune cells after surgery.
Europ. Surg. Res. 14/2, 1982: 109
- (66) GUTTMAN, R.D., POULSEN, R.S.:
Fluorescence activated cells sorter analysis of lymphocyte subsets after renal transplantation.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983: 1160-1162
- (67) HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E., SOOTS, A.:
In situ effector mechanism in rat kidney allograft rejection III. Kinetics of the inflammatory response and generation of donor directed killer cells.
Scand. J. Immunol. 10, 1979: 95-108
- (68) HÄYRY, P., SOOTS, A., V. WILLEBRAND, E., WIKTOROWICZ, K.:
Composition, subclass distribution, and preliminary analysis of the function of host inflammatory cells infiltrating renal allograft during rejection.
Transplant. Proc. Vol. XI, No.1, 1979: 785-789

- (69) HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E.:
Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts.
Annals of Clinical Research 13, 1981: 288-306
- (70) HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E.:
Monitoring of human renal allograft rejection with fine needle aspiration cytology.
Scand. J. Immunol. 13, 1981: 87-97
- (71) HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E., AHONEN, J., EKLUND, B., LAUTENSCHLAGER, I.:
Monitoring of organ allograft rejection by transplant aspiration cytology.
Annals of Clin. Research 13, 1981: 264-287
- (72) HÄYRY, P.:
Immunobiology of transplant rejection.
Annals of Clin. Research 13, 1981: 172-198
- (73) HAHN, B.H., MAC DERMOTT, R.P., JACOBS, S.B., PLETSCHER, L.S., BEALE, M.G.:
Immunosuppressive effects of low doses of glucocorticoids:
Effects on autologous and allogenic mixed leucocyte reactions.
J. Immunol. Vol.124, 1980: 2812-2817
- (74) HALLMANN, L.:
Klinische Chemie und Mikroskopie
Thieme Verlag Stuttgart, 10. Auflage, 1966: 338-353
- (75) HAMBERGER, C., LOISANCE, D., TAVOLARO, O., TILLEMENT, J.P., CHACHERA, J.P.:
Computer assisted posology of CsA in cardiac allograft transplantation.
Europ. Surg. Res. 16, S1, 1984: 41
- (76) HAMMER, C., LAND, W., MAYER, P.:
Fine needle aspiration cytology on human kidney transplants under ALG therapy.
Europ. Surg. Res. 13, 1981: 78
- (77) HAMMER, C., CASTRO, L.A., LAND, W.:
Suppressor activity in human renal allograft recipients.
XVIIIth Congress of the EDTA, Paris 1981, Abstract Vol.: 48
- (78) HAMMER, C., MAYER, P., KREUZER, E., LAND, W.:
Feinnadelaspirationszytologie zur Diagnose von Nierentransplantatabstoßung.
Langenbecks Arch. Chir. 355, 1981: 642

- (79) HAMMER, C., LAND, W., HILLEBRAND, G.,
RÖSSLER, E.:
Überwachung von Nierenabstoßungsreaktionen
durch Feinnadelaspirationszytologie.
Chir. Forum 82, Langenbecks Arch., Chir.
Suppl. 1982: 17
- (80) HAMMER, C.:
Immunologische Überwachung der Nieren-
transplantationspatienten.
Transplantationszentrum München 1976-1982,
Hrsg. W. Land: 141-154
- (81) HANCOCK, W.W., THOMSON, N.M., ATKINS, R.C.:
Monoclonal antibody analysis of
interstitial cell infiltrate during human
renal allograft rejection.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
352-355
- (82) HEILMEYER, L., BEGEMANN, H.:
Atlas der Klinischen Hämatologie.
Springer Verlag, 1978: 1-77
- (83) HERSH, E., OPPENHEIM, J.:
Inhibition of in vitro lymphocyte trans-
formation during chemotherapie in man.
Cancer Res. 27, 1967: 98-105
- (84) HITCHINGS, G.H., ELION, G.B.:
Chemical suppression of the immune response
Pharmacol. Rev. 15, 1963: 365-405
- (85) HO MONTO
The lymphocyte in infections with EBV and
CMV.
J. Infect. Dis. Vol.143, 1981: 857-862
- (86) JORDAN, M.C., SHANLEY, J.D., STEVENS, J.G.:
Immunosuppression reactivates and dissemi-
nates latent murine CMV.
J. Gen. Virol. 37, 1977: 419-423
- (87) KAHAN, B.D., RIED, M., NEWBURGER, J.:
Pharmacokinetics of CsA in human renal
transplantation.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
446-453
- (88) KAMMER, G.M., SMITH, M., MITCHELL, R.:
Capping of human T-cell specific deter-
minants: Kinetics of capping and receptor
re-expression and regulation by the cyto-
skeleton.
J. Immunol. Vol. 130, No.1, 1983: 38-44

- (89) KAPLAN, M.P., LYSZ, K., ROSENBERG, A.,
ROSENBERG, J.C.:
Suppression of interleukin-2 produktion by
methylprednisolon.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
407-410
- (90) KAY, H.D., HOROWITZ, D.A.:
Evidence by reactivity with hybridoma anti-
bodies for a probable myeloid origin of
peripheral blood cells active in natural
cytotxicity and anti-body dependent cell-
mediated cytotoxicity.
J. Clin. Invest. 66, 1980: 847-851
- (91) KERMAN, R.M., VAN BUREN, C.T., PAYNE, W.,
FLECHNER, S., KAHAN, B.D.:
Immune monitoring of renal allograft
recipients treated with Cyclosporine-A or
azathioprine using donor-specific assays
and monoclonal T-cell reagents.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.3, 1983:
1971-1973
- (92) KÖHLER, G., MILSTEIN, C.:
Continous cultures of fused cells secreting
antibody of predefined specificity.
Nature Vol.256, 1975: 495-497
- (93) KOLLER, C., STADLER, J., HAMMER, C.,
SCHNEIDER, B., BRENDDEL, W.:
Evaluation of FNAB and TAC by Coulter
counting.
In: 2nd International Workshop on Renal
Transplant Cytology, Paris, 1983. Wichtig
Editore, Milano, Italy: 39-44
- (94) KOLLER, C., HAMMER, C., GOKEL, J.M., LAND,
W., HILLEBRAND, D., CASTRO, L.A., STADLER,
J., WEBER, B.:
Correlation between core biopsy and
aspiration cytology.
Transplant. Proc. Vol. XVI, No.5, 1984:
1298-1300
- (95) KREIS, H., CHKOFF, N., DROZ, D., NOEL,
L.H., TOLANI, M., DESCAMPS, J.M.,
CHATENOUD, L., LACOMBE, M., CROSNIER, J.:
Nonsteroid anitnflammatory agents as a
substitute treatment for steroids in ATG
treated cadaver kidney recipients.
Transplant., Vol.37, No.2, 1984: 139-144

- (96) KRENSKY, A.M., REISS, C.S., MIER, J.W.,
STROMING, J.L., BURAKOFF, S.J.:
Long-term human cytolytic T-cell lines
allospecific for HLA'Dr6 antigen and OKT 4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1982:
2363-2369
- (97) KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., REINHERZ, E.L.,
SCHLOSSMAN, S.F.:
Monoclonal antibodies defining distinctive
human T-cell surface antigens.
Science Vol.206, 1979: 347-349
- (98) KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G.:
Functional and developmental compartment of
human T-lymphocytes.
Vox Sang. 39, 1980: 121-127
- (99) KYRIAKIDES, G.K., FLAA, C., OLSON, L.,
MILLER, J.:
Immune monitoring in transplant patients
treated with cyclosporine.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.3, 1983:
1933-1935
- (100) LAND, W.:
Klinik der Organtransplantation.
Transplantationszentrum München 1976-1982,
Hrsg. W. Land: 110-112
- (102) LERNER, M.:
Infections with herpes simplex virus.
Harrison's Principles of Internal Medicine
McGraw Hill intern. book company 1983:
1162-67
- (103) LEVY, J., BARNETT, E.V., MAC DONALD, N.S.,
KLINENBURG, J.R., PEARSON, C.M.:
The effect of azathioprine on gammaglobulin
synthesis in man.
J. Clin. Invest. 51, 1972: 2233-38
- (104) LOPEZ, C., SIMMONS, R.L., MAUER, S.M.,
NAJARIAN, J.S., GOOD, R.A.:
Association of renal allograft rejection
with virus infections.
Am. J. Med. 56, 1974: 280-289
- (105) LOVELAND, B.E., MC KEWCIE, I.F.C.:
Which T-cells cause graft rejection?
Transplant., Vol.33, 1982: 217-219

- (106) MACCARIO, R., NESPOLI, L., MINGRAT, G.,
VITIELLO, A., UGAZIO, A., BURGIO, G.R.:
Lymphocyte subpopulations in the neonate:
Identification of an immature subset of OKT
8 positive, OKT 3 negative cells.
J. Immunol. Vol.130, No.3, 1983: 1129-1131
- (107) MARKER, S.C., ASCHER, N.L., KALIS, J.M.,
SIMMONS, R.L., NAJARIAN, J.S., BALFOUR,
H.H.:
Epstein-Barr virus antibody responses and
clinical illness in renal transplant reci-
pients.
Surgery 85, 1979: 433-440
- (108) MASUR, H., MICHAELIS, M.A., GREENE, J.B.:
An outbreak of community acquired
pneumocystis carinii pneumonia: Initial
manifestation of cellular immune dys-
function.
N. Engl. J. Med. 305, 1981: 1431-1438
- (109) MEDAWAR, P.B.:
Biological effects of heterologous anti-
lymphocyte sera.
Human Transplantation, hrsg. v. F.T.Rapaport
und J. Dausset, Grune and Stratton, New
York, 1968: 501-509
- (110) MOORE, F.D.:
The unbreached barrier.
In: The give and take of tissue trans-
plantation. eds. F.D. Moore, Simon and
Schuster, New York, 1972: 66-94
- (111) MORIMOTO, C., DISTASO, J., BOREL, Y.,
SCHLOSSMAN, S.F., REINHERZ, E.L.:
Communicative interactions between subpopu-
lations of human T-lymphocytes required for
generation of suppressor-effector function
in primary antibody response.
J. Immunol. 128, 1982: 1645-1650
- (112) MORRIS, P.J., TING, A.:
The crossmatch in renal transplantation.
Tissue Antigens 17, 1981: 75-82
- (113) MORRIS, P.J., CARTER, N.P., CULLER, P.R.,
THOMPSON, J.F., WOOD, R.F.M.:
Role of T-cell subset monitoring in renal
allograft recipients.
N. Engl. J. Med. 306, 1982: 1110-1111

- (114) NANNI-COSTA A., VANGELISTA, A., FRASCA, M.,
STEFONI, S., BONOMINI, V.:
T-cell subsets in renal allograft
recipients.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
1176-1177
- (115) NARAGI, S., JACKSON, G.G., JONASSON, O.,
YAMASHIROYA, H.M.:
Prospective study of prevalence, incidence
and source of herpes virus infections in
patients with renal allografts.
J. Infect. Dis. 136, 1977: 531-540
- (116) OLDING, L.B., JENSEN, F.C., OLDSTONE, M.B.:
A pathogenesis of CMV infection. Activation
of virus from bone marrow derived lympho-
cytes by in vitro allogenic reaction.
J. Exp. Med. 141, 1975: 561-572
- (117) OYER, P.E.:
One year experience with CsA in clinical
heart transplantation.
Heart Transplant. 1: 285-290
- (118) OZER, H., STRELKAUSUS, A.J., CALLERY, R.T.,
SCHLOSSMAN, S.F.:
The functional dissection of human peri-
pheral null cells with respect to antibody-
dependent cellular toxicity and natural
killing.
Eur. J. Immunol. 9: 112-118
- (119) PALACIOS, R.:
Cyclosporin-A and the OKT 3 monoclonal
antibody exert their respective inhibitory
and mitogenic activity on T-cells by inter-
acting with the same receptors.
J. Clinical Immunology Vol.2, No.3, (July
Suppl. 1982): 15-19
- (120) PASS, R.F., LONG, W.K., WHITLEY, R.J.,
SOONG, S.J., DIETHELM, A.G., REYNOLDS, D.W.:
Productive infection with CMV and HSV in
renal transplant recipients: Role of source
of kidney.
J. Infect. Dis. 137, 1978: 556-563
- (121) PASS, R.F., REYNOLDS, D.W., WHELCHER, J.D.,
DIETHELM, A.G., ALFORD, C.A.:
Impaired lymphocyte transformation response
to cytomegalovirus and phytohemagglutinin
in recipients of renal transplant:
Association with ATG.
J. Infect. Dis. Vol.143, 1981: 259-265

- (122) PASS, R.F., GRIFFITHS, P.D., AUGUST, A.M.:
Antibody response to cytomegalovirus after
renal transplantation: Comparison of
patients with primary and recurrent
infections.
J. Infect. Dis. Vol.147, No.1, 1983: 40-46
- (123) PATTENGALE, P.K., SMITH, R.W., GERBER, P.:
B-cell characteristics of human peripheral
and cord blood lymphocytes transformed by
EBV.
J. Natl. Cancer Inst., 52, 1974: 1081-1086
- (124) PETERS, J.H., COONS, A.H.:
Fluorescent antibody as specific cyto-
chemical reagents.
Methods of Immunology and Immunchemistry
Vol.5, 1976: 424-437
- (125) PETERSON, P.K., RYNAIEWICZ, J.J., SIMMONS,
R.L., FERGUSON, R.M.:
Decreased incidence of overt CMV disease in
renal allograft recipients receiving CsA.
Transplant. Proc. Vol. XV, 1983: 457-459
- (126) PICHLMAYR, R., BRENDL, W., ZENKER, R.:
Production and effect of heterologous
anti-canine lymphocyte serum.
Surgery 61, 1967: 774-783
- (127) PIERES, M., REBOUAH, J.P., KOURILSKY, F.M.,
DOSSETO, M., MERCIER, P., MAWAS, C.,
MALISSEN, B.:
Cross reaction between mouse Ia and human
HLA-D/DR antigens analysed with monoclonal
antibodies.
J. Immunol. Vol.126, No.6, 1981: 2424-2429
- (128) PLATT, J.L., LE JIEN, T.W., MICHAEL, A.F.:
Interstitial mononuclear cell populations
in renal graft rejection.
J. Exp. Med. Vol.155, 1982: 17-30
- (129) REDDEHASE, M.J., KEIL, G.M., KOSZINOWSKI,
U.H.:
The cytolytic T-lymphocyte response to the
murine CMV.
J. Immunol. Vol.132/1, 1984: 482-489
- (130) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G.,
SCHLOSSMAN, S.F.:
A monoclonal antibody with selectiv reac-
tivity with functionally nature human
thymocytes and all periphall human T-cells.
J. Immunol. Vol.123, No.3, 1979: 1312-1317

- (131) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F.:
Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol.76, No.8, 1979: 4061-4065
- (132) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F.:
Further characterization of the human inducer T-cell subset defined by monoclonal antibody.
J. Immunol. Vol.123, No.6, 1979: 2894-2896
- (133) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., PESANDO, J.M., RITZ, J., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F.:
Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody.
J. Exp. Med. 150, 1979: 1472-1482
- (134) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F.:
A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T-cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH₂.
J. Immunol. Vol.124, No.3, 1980: 1301-1307
- (135) REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., LEVEY, R.H., SCHLOSSMAN, S.F.:
Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leucemic lymphoblasts of T-cell lineage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.77, No.3, 1980: 1588-1592
- (136) REINHERZ, E.L., MOROMOTO, C., PENTA, A.C., SCHLOSSMAN, S.F.:
Regulation of B-cell immunoglobulin secretion by functional subsets of T-lymphocytes in man.
Eur. J. Immunol. 10, 1980: 570-572
- (137) REINHERZ, E.L., O'BRIEN, C., ROSENTHAL, P., SCHLOSSMAN, S.F.:
The cellular basis for viral-induced immunodeficiency:
Analysis by monoclonal antibodies.
J. Immunol. Vol.125, No.3, 1980: 1269-1274
- (138) RICHARDSON, W.P., CIVIN, R.B., CHEESEMAN, S.H.:
Glomerulopathy associated with CMV viremia in renal allografts.
N. Engl. J. Med. 305, 1981: 57-63

- (139) RING, J., SEIFERT, J., LOB, G., LAND, W.,
COULIN, K., BRENDDEL, W.:
Zum Risiko einer ALG-Therapie. Mögliche
Nebenwirkungen, Prophylaxe und Behandlung.
Klin. Wochenschrift 51, 1973: 487-493
- (149) RITCHIE, A.W.S., OSWALD, I., MICKLEM, S.H.,
BOYD, J.E., ELTON, R.A., JAZWINSKA, E.,
JAMES, K.:
Circadian variation of lymphocyte subpopu-
lations: A study with monoclonal antibodies.
Brit. Med. J. Vol.286, 1983: 1773-1775
- (141) RÖSSLER, E.:
Wertigkeit der Feinnadelbiopsie in der Dia-
gnostik pathologischer Veränderungen nach
allogener Nierentransplantation.
Dissertationsarbeit an der Ludwig-Maxi-
milians-Universität München, 1983: 17-22
- (142) RUBIN, R.H., COSIMI, A.B., TOLKOFF-RUBIN,
N.E., RUSSEL, P.S., HIRSCH, M.S.:
Infectious disease syndromes attributable
to cytomegalovirus and their significance
among renal transplant recipients.
Transplantation, Vol.24, 1977: 458-464
- (143) RUBIN, R.H.:
Infections in the renal transplant patients.
In: Rubin, R.H., Young, L.S. eds.: Clinical
approach to infection in the compromised
host, New York: Plenum Medical Books, 1981:
553-606
- (144) RUBIN, R.H., COSIMI, A.B., HIRSCH, M.S.,
HERRIN, J.T.:
Effects of ATG on CMV infections in renal
transplant recipients.
Transplantation, Vol.31, 1981: 143-145
- (145) SACHS, L.:
Angewandte Statistik: Planung und Auswer-
tung, Methoden und Modelle.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1974:
209-264
- (146) SALAMAN, J.R.:
Pharmacologic immunosuppression.
Transplant. Proc. Vol. XIII, No.1, 1981:
311-314
- (147) SCHLOSSMAN, S.F., CHESS, L., HUMPHREYS,
R.E., STROMINGER, J.L.:
Distribution of Ia-like molecules on the
surface of normal and leukemic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1976:
1288-1292

- (148) SCHOOLEY, R.T., HIRSCH, M.S., COLVIN, R.B., COSIMI, A.B., TOLKOFF-RUBIN, N.E., MC CLUSKEY, R.T., BURTON, R.C., RUSSELL, P.S., HERRIN, J.T., DELMONICO, F.L., GIORGI, J.V., HEULE, W., RUBIN, R.M.: Association of herpesvirus infections with T-lymphocyte subset alterations, glomerulopathy and opportunistic infections after renal transplantation. N. Engl. J. Med. Vol.308, No.6, 1983: 307-313
- (149) STELZER, G.T., MC LEISH, K.R., LORDEN, R.E., WATSON, S.L.: Alterations in T-lymphocyte subpopulations associated with renal allograft rejections. Transplantation, Vol.37, No.3, 1984: 261-264
- (150) STILLER, C.R., KEOWN, P.A.: Immunologic monitoring: Current perspectives and clinical implications. Transplant. Proc. Vol. XIII, No.3, 1981: 1699-1711
- (151) STROM, T.B., TILNEY, N.L., PARADYSZ, J.M., BANCEWICZ, J., CARPENTER, C.B.: Cellular components of allograft rejections: Identity, specificity and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. Transplantation, Vol.118, 1977: 2020-2026
- (152) SUCIU-FOCA, N., KHAN, R., HARDY, M., GODFREY, M., SUSINNO, E., REED, E., WOODWARD, K., REEMTSMA, K.: Expression of HLA-D and DR gene products on in vitro and in vivo primed human T-cells. Transplant. Proc. Vol. XIII, No.1, 1981: 1020-1025
- (153) TEN BERGE, R.J.M., SCHELLEKENS, P., SURACHNO, S.: The influence of therapy with azathioprine and prednisone on the immune system of kidney transplant recipients. Clin. Immunol. Immunophthol. 21, 1981: 20-32
- (154) THOMAS, J.M., THOMAS, F.T., CARVER, F.M.: Immunosuppressive effectiveness of ATG correlates with induction of suppressor cells. Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983: 744-747

- (155) THOMAS, Y., SOSMAN, J., IRIGOYEN, O.,
FREEDMAN, S.M., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G.,
CHESS, L.:
Functional analysis of human T-cell subsets
defined by monoclonal antibodies.
J. Immunol. Vol.125, No.6, 1980: 2402-2407
- (156) THOMPSON, J.F., CARTER, N.P., CULLEN, P.R.,
BEWICK, A.L.T., WOOD, R.F.M., MORRIS, P.J.:
Monitoring lymphocyte subpopulations in
renal allograft recipients.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
1157-1159
- (157) THOMPSON, J.F., CHALMERS, D.H.K., CARTER,
N.P., WOOD, R.F.M., MORRIS, P.J.:
Clinical and immunologic effects of
conversion to CsA therapy in long-term
renal allograft recipients.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.3, 1983:
1930-1932
- (158) TILNEY, N.L., GAROVOY, M.R., BUSCH, G.J.,
STROM, T.B., GRAVES, M.J., CARPENTER, C.B.:
Rejected human renal allografts: Recovery
and characteristics of infiltrating cells
and antibody.
Transplantation, Vol.28, No.5, 1979: 421-426
- (159) TING, A., MORRIS, P.J.:
HLA and Organ Transplantation.
Clinical Surgery International, Vol.3,
1982: 28-37
- (160) TODD, R.F., NADLER, L.M., SCHLOSSMAN, S.F.:
Antigens on human monocytes identified by
monoclonal antibodies.
J. Immunol. Vol.126, No.4, 1981: 1435-1442
- (161) UNDRITZ, E.:
Sandoz Atlas of Haematology.
Sandoz LTD Basel, 1978
- (162) VAN BUREN, C.T., KERMAN, R.M., AGOSTINO,
G., FLECHNER, S.M., PAYNE, W.D., KAHAN,
B.D.:
Effect of CsA on immunoregulatory cells of
renal allograft recipients.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
527-530
- (163) VAN ES, A., OLJANS, P.J., HENDRIK, G.F.J.:
Lymphocyte subpopulations and prognosis
after renal transplantation.
Dial. Transplant., 12, 1983: 113-118

- (164) VAN ES, A., MEYER, C.J.M., OLJANS, P.J.,
TANKE, H.J., VAN ES, L.A.:
Mononuclear cells in renal allografts:
Correlation with peripheral blood T-
lymphocyte subpopulations and graft
prognosis.
Transplantation, Vol.37, No.2, 1984: 134-138
- (165) VAN WAUWE, J., DE MEY, J.R., GOOSSENS, J.G.:
OKT 3: A monoclonal anti-human T-lymphocyte
antibody with potent mitogenic properties.
J. Immunol. Vol.124, 1980: 2708-2713
- (166) VAN WAUWE, J., GOOSSENS, J.G.:
Monoclonal anti-human T-lymphocyte anti-
bodies: Enumeration and characterisation of
T-cell subsets.
Immunology 42, 1981: 157-164
- (167) VAN WAUWE, J., GOOSSENS, J., DECOCK, W.,
KUNG, P., GOLDSTEIN, G.:
Suppression of human T-cell mitogenesis and
E-rosette formation by the monoclonal anti-
body OKT 11A.
Immunology 44, 1981: 865-871
- (168) VON WILLEBRAND, E., SOOTS, A., HÄYRY, P.:
In situ effector mechanisms in rat kidney
allograft rejection. I. Characterisation of
the host cellular infiltrate in rejecting
allograft parenchyma.
Cellular Immunology 46, 1979: 309-326
- (169) VON WILLEBRAND, E., SOOTS, A., HÄYRY, P.:
In situ effector mechanisms in rat kidney
allograft rejection. II. Heterogeneity of
the effector cells in the inflammatory
infiltrate vs that in the spleen of the
recipient rat.
Cellular Immunology 46, 1979: 327-336
- (170) VON WILLEBRAND, E.:
Fine-needle aspiration cytology of human
renal transplants.
Clinical Immunology and Immunopathology 17,
1980: 309-321
- (171) VON WILLEBRAND, E.:
OKT 4/8 ratio in the blood and in the graft
during episodes of human renal allograft
rejection.
Cellular Immunology 77, 1983: 196-201
- (172) WAGNER, H.:
Cyclosporin-A: Mechanism of action.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1, 1983:
523-526

- (173) WEBER, B., HAMMER, C., WELTE, M., STADLER, J., KOLLER, C., CSAPO, C., LAND, W., HILLEBRAND, G., CASTRO, L.A.:
Increase of NK-cells in rejecting kidney grafts.
Transplant. Proc. Vol. XVI, No.5, 1984:
1177-1178
- (174) WHITE, D.J.C., CALNE, R.Y.:
An analysis of factors influencing post-transplant CsA serum levels in organ graft recipients.
Miami, Florida, Congress on Immunol. Monitoring, 1982: Abstract Vol., S65
- (175) WIDMER, M.B., ROOPENIAN, D.C., BACH, F.M.
Cytolytic T-lymphocyte clones with helper cell characteristics.
Transplant. Proc. Vol. XV, No.1., 1983:
393-395

LEBENS LAUF

Name: Stadler Josef
geboren: 16.11.1956 in Rosenheim
Vater: Stadler Josef, Chemiearbeiter
Mutter: Stadler Irmengard, geb. Stürzer

Ausbildung: 1963-1967 Volksschule in Eggstätt
1967-1976 Ludwig-Thoma-Gymnasium
in Prien
1976 Allgemeine Hochschulreife
1976-1978 Zivildienst an der Rettungs-
dienststelle des Roten
Kreuzes in Prien
1.4.1978 Beginn des Studiums der
Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Uni-
versität in München
2.4.1980 Ärztliche Vorprüfung
13.4.1981 Erster Abschnitt der ärzt-
lichen Prüfung
1.5.1981 Beginn der Doktorarbeit im
Institut für Chirurgische
Forschung der LMU
7.4.1983 Zweiter Abschnitt der ärzt-
lichen Prüfung
5.10.1984 Schriftlicher Teil des
dritten Abschnitts der ärzt-
lichen Prüfung
24.10.1984 Mündlicher Teil des dritten
Abschnitts der ärztlichen
Prüfung
29.10.1984 Approbation als Arzt

Worte des Dankes

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Brendel für die Aufnahme am Institut sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Betreuung meiner Arbeit und für die zahlreichen Anregungen zur Ausarbeitung der Methodik als auch zur Vertiefung der Thematik.

Herrn Prof. Dr. med. W. Land danke ich für die Zustimmung zur Durchführung der Feinnadelbiopsien am Patienten sowie für die Überlassung der klinischen Daten.

Frau Dr. Schneider, Herrn Dr. Banthien, Herrn Dr. Castro, Herrn Dr. Habersetzer, Herrn Dr. Hillebrand und Herrn Dr. Welte möchte ich für die Durchführung der Feinnadelbiopsien und die kollegiale Zusammenarbeit herzlich danken.

Für die täglichen Hilfeleistungen bin ich den Mitarbeitern der Labors des Instituts für chirurgische Forschung und der Station H5 des Klinikums Großhadern sehr dankbar.

